

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-511722

(43) 公表日 平成11年(1999)10月12日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 0 1 B 25/32

C 0 1 B 25/32

B

A 6 1 L 27/00

A 6 1 L 27/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願平8-535130  
(86) (22) 出願日 平成8年(1996)5月20日  
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997)11月17日  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 6 / 0 7 2 7 3  
(87) 国際公開番号 W O 9 6 / 3 6 5 6 2  
(87) 国際公開日 平成8年(1996)11月21日  
(31) 優先権主張番号 0 8 / 4 4 6 , 1 8 2  
(32) 優先日 1995年5月19日  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 エテックス コーポレイション  
アメリカ合衆国 02139 マサチューセッ  
ツ, ケンブリッジ, シドニー ストリート  
38  
(72) 発明者 リー, ドースク ディー,  
アメリカ合衆国 02146 マサチューセッ  
ツ, ブルックライン, ロングウッド アベ  
ニュー 50, アpartment 518  
(72) 発明者 レイ, クリスティアン  
フランス国 エフ31320 カスタネ, オー  
ルビル, リウーディ レダム  
(74) 代理人 弁理士 倉内 基弘 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨代用物質及びその製造方法

(57) 【要約】

本発明は、標準の不活性な非晶質リン酸カルシウム沈殿を高反応性の非晶質固体に転化する方法を提供する。非晶質固体は、他のリン酸カルシウム固体と反応させて生物安定性及び構造上の保全性を備えた結晶性不良な合成ヒドロキシアパタイトを形成するのに用いることができる。この新規な非晶質物質を他のリン酸カルシウムと37℃又はそれよりも低い温度で反応させて結晶性不良な合成ヒドロキシアパタイトからなる骨様物質を形成することができる。

**【特許請求の範囲】**

## 1. 下記：

非晶質リン酸カルシウムを得るように、カルシウムイオン、ホスフェートイオン及び第三イオンを反応させ；及び

反応性の非晶質リン酸カルシウムを得るように、非晶質リン酸カルシウムにおいて第三イオンの少なくとも一部を除く

ことを含む反応性の非晶質リン酸カルシウムの製造方法。

## 2. 第三イオンがカーボネートイオンを含む請求項1の方法。

3. カルシウムイオン、ホスフェートイオン及び第三イオンを反応させる工程が、カルシウム、ホスフェート及び第三イオンを含む溶液から非晶質リン酸カルシウムを沈殿させることを含む請求項1の方法。

4. 溶液が水溶液であり、除去工程が非晶質リン酸カルシウムから残留水の一部を除くことを含む請求項1の方法。

## 5. 溶液が非水性溶液である請求項1の方法。

6. 反応性の非晶質リン酸カルシウムが、カルシウム対ホスフェート比約1.1～約1.9の範囲を有する請求項1の方法。

7. 第三イオンを、生成物反応性の非晶質リン酸カルシウム中のカルシウム対ホスフェート比を変更するのに選ぶ請求項1の方法。

8. 第三イオンを、非晶質リン酸カルシウムの非晶質性を安定にさせるのに選ぶ請求項1の方法。

## 9. 更に、下記の工程：

リン酸カルシウムの非晶質性を保つのに選ぶ条件下で非晶質リン酸カルシウムを乾燥させた後に第三イオンを除く  
を含む請求項1の方法。

10. 第三イオンを除く工程が、リン酸カルシウムの非晶質性を保つのに選ぶ条件下で加熱する工程を含む請求項1の方法。

11. 第三イオンを除く工程が、第三イオンを分解する工程を含む請求項1の方法。

## 12. 第三イオンを除く工程が、非晶質リン酸カルシウムから第三イオンを溶

解する工程を含む請求項1の方法。

13. カーボネートを除く工程が、非晶質リン酸カルシウムカーボネート含量の約60%までを除くことを含む請求項3の方法。

14. 反応性の空位を、除去工程の間に非晶質リン酸カルシウム中に導入する請求項1の方法。

15. 更に、下記：

骨再生用タンパク質又は抗生物質を非晶質の炭酸塩化されたリン酸カルシウムに加えた後に乾燥することを含む請求項1の方法。

16. 非晶質特性を少なくとも90%有しかつ37℃の水中で二リン酸二カルシウムとの混合物として1:1で調製した場合に、混合物は約10～約60分以内で硬化することを特徴とする反応性の非晶質リン酸カルシウム物質。

17. 非晶質リン酸カルシウムのカーボネートプレー成分を、プレー成分を熱分解してガス状又はベーパー状副生物とすることによって除くことによって得られる反応性の非晶質リン酸カルシウム。

18. 非晶質リン酸カルシウムの化学変化を起こしやすい成分を、成分を熱分解してガス状又はベーパー状副生物とすることによって除くことによって得られる、反応性の非晶質リン酸カルシウム。

19. 非晶質特性を少なくとも90%有しかつ37℃の水中で二リン酸二カルシウムとの混合物として1:1で調製した場合に、反応は約40分以内で実質的に完全な混合物になることを特徴とする反応性の非晶質リン酸カルシウム物質。

20. 反応が約75分以内で実質的に完了する請求項17の反応性の非晶質リン酸カルシウム物質。

21. カルシウム対ホスフェート比が約1.1～約1.9の範囲である請求項16、17又は18の反応性の非晶質リン酸カルシウム。

22. Ca/P比が約1.58である請求項16、17又は18の反応性の非晶質リン酸カルシウム。

23. 下記：

請求項16、17又は18の反応性の非晶質リン酸カルシウムを第二のリン酸

カルシウムと、第二のリン酸カルシウム及び反応性の非晶質リン酸カルシウムをヒドロキシアパタイト性リン酸カルシウムを形成する割合で反応させることを含む結晶性不良なヒドロキシアパタイトの製造方法。

24. 下記：

請求項16、17又は18の反応性の非晶質リン酸カルシウムをプロモーターと反応させることを含み、プロモーターは、反応性の非晶質リン酸カルシウムをヒドロキシアパタイト性リン酸カルシウムに転化させるように選ぶ結晶性不良なヒドロキシアパタイトの製造方法。

25. 結晶性不良なヒドロキシアパタイト性リン酸カルシウムが生物吸収可能である請求項23の方法。

26. 反応を液中で行い、液を水、生理学的に許容し得るpH緩衝溶液、塩水、血清及び組織培地からなる群より選ぶ請求項23の方法。

27. 反応の工程が、下記：

非晶質リン酸カルシウムと第二のリン酸カルシウムとを混合し；及び水溶液を混合物に、反応を開始させる程の量で加えることを含む請求項23の方法。

28. プロモーターが非晶質リン酸カルシウムを含む請求項24の方法。

29. 反応性の非晶質リン酸カルシウム物質を、

非晶質リン酸カルシウムを得るように、カルシウムイオン、ホスフェートイオン及び第三イオンを反応させ；及び

反応性の非晶質リン酸カルシウムを得るように、非晶質リン酸カルシウムにおいて第三イオンの少なくとも一部を除くことによって得る請求項23の方法。

30. 結晶性不良なヒドロキシアパタイトのCa/P比が約1.5よりも小さい請求項23の方法。

31. 第二のリン酸カルシウムが非晶質又は微結晶性である請求項23の方法。

32. 更に、下記：

骨再生用タンパク質又は抗生物質を混合物に加える

ことを含む請求項23の方法。

33. 実質的に図7dに示す通りのX線回折図を有する結晶性不良なヒドロキシアパタイトを含む吸収可能な骨代用物質。

34.  $2\theta$  値  $26^\circ$ 、 $28.5^\circ$ 、 $32^\circ$  及び  $33^\circ$  に広いピークを含むX線回折図を有する結晶性不良なヒドロキシアパタイトを含む吸収可能な骨代用物質。

35. ラット筋肉内部位に入れた際に、骨代用物質の少なくとも100mgの吸収が、1カ月以内に完了することを特徴とする結晶性不良なヒドロキシアパタイトを含む吸収可能な骨代用物質。

36. 骨代用物質の少なくとも300mgの吸収が、1カ月以内に完了する請求項35の吸収可能な骨代用物質。

37. 非晶質リン酸カルシウムと第二ホスフェートとを流体中で反応させることから調製する際に、反応混合物は約22℃において60分よりも長い時間の後に硬化し、かつ反応混合物は37℃において約10～約60分以内に硬化することを特徴とする請求項33、34又は35の吸収可能な骨代用物質。

38. 混合物が、約22℃において約60分よりも長い時間の間注入可能である請求項37の吸収可能な骨代用物質。

39. 混合物が、約22℃において約60分よりも長い時間の間成形可能である請求項37の吸収可能な骨代用物質。

40. カルシウム対ホスフェート比が約1.1～1.9の範囲である請求項33、34又は35の吸収可能な骨代用物質。

41. カルシウム対ホスフェート比が約1.3～1.5の範囲である請求項33、34又は35の吸収可能な骨代用物質。

42. 下記：

請求項16、17又は18の反応性の非晶質リン酸カルシウムと、第二のリン酸カルシウム粉末との混合物；及び

所望のコンシステンシーをもたらす程の量の流体を含み、該混合物は、約22℃で硬化することができる、吸収可能な骨代用物質として使用するのに適した成形可能なペースト。

## 43. 下記：

請求項16、17又は18の反応性の非晶質リン酸カルシウムと、プロモーターとの混合物；及び

所望のコンシステンシーをもたらす程の量の流体を含み、プロモーターは、反応性の非晶質リン酸カルシウムをヒドロキシアパタイト性リン酸カルシウムに転化させるように選び、該混合物は、約22℃で硬化することができる、骨代用物質として使用するのに適した成形可能なペースト。

44. 混合物が、約22℃において60分よりも長い時間の後に硬化し、かつ混合物が約37℃において約10～60分以内で硬化する請求項42のペースト。

45. 混合物が、約22℃において約60分よりも長い時間の間注入可能である請求項44のペースト。

46. 混合物が、約22℃において約60分よりも長い時間の間成形可能である請求項44のペースト。

47. 液を水、生理学的に許容し得るpH緩衝溶液、塩水、血清及び組織培地からなる群より選ぶ請求項42のペースト。

48. 第二のリン酸カルシウム粉末が非晶質又は微結晶性である請求項42のペースト。

49. 更に、骨再生用タンパク質又は抗生物質を含む請求項42のペースト。

## 50. 下記：

骨増殖を要する部位に、請求項16、17又は18の反応性の非晶質リン酸カルシウムと、第二のリン酸カルシウム粉末との混合物を所望のコンシステンシーをもたらす程の量の流体で適用し；及び

混合物を硬化させることを含む骨増殖を助成する方法。

## 51. 更に、下記：

骨再生用タンパク質又は抗生物質を混合物に加えた後に適用することを含む請求項50の方法。

52. 液を水、生理学的に許容し得るpH緩衝溶液、塩水、血清及び組織培地

からなる群より選ぶ請求項50の方法。

53. 結晶性不良なヒドロキシアパタイト性リン酸カルシウムが生物吸収可能である請求項24の方法。

54. 反応を液中で行い、液を水、生理学的に許容し得るpH緩衝溶液、塩水、血清及び組織培地からなる群より選ぶ請求項24の方法。

55. 反応性の非晶質リン酸カルシウム物質を、  
非晶質リン酸カルシウムを得るように、カルシウムイオン、ホスフェートイオン及び第三イオンを反応させ；及び

反応性の非晶質リン酸カルシウムを得るように、非晶質リン酸カルシウムにおいて第三イオンの少なくとも一部を除く  
ことによって得る請求項24の方法。

56. 結晶性不良なヒドロキシアパタイトのCa/P比が約1.5よりも小さい請求項24の方法。

57. 更に、下記：

骨再生用タンパク質又は抗生物質を混合物に加える  
ことを含む請求項24の方法。

58. 混合物が、約22℃において60分よりも長い時間の後に硬化し、かつ混合物が約37℃において約10～60分以内で硬化する請求項43のペースト。

59. 液を水、生理学的に許容し得るpH緩衝溶液、塩水、血清及び組織培地からなる群より選ぶ請求項43のペースト。

## 【発明の詳細な説明】

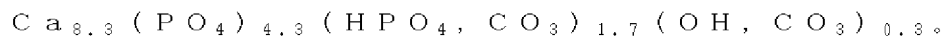
## 骨代用物質及びその製造方法

発明の分野

本発明は、人又は動物の骨代用物質として及びその他の目的に有用な結晶性不良な合成ヒドロキシアパタイトに関する。発明は、更に、結晶性不良なヒドロキシアパタイトを低い温度で形成するのに有用な非晶質ホスフェート化合物の合成に関する。

発明の背景

リン酸カルシウムは、硬組織（硬骨、軟骨、歯エナメル質及び象牙質）の主成分である。自然発生の骨ミネラルは、ヒドロキシアパタイト構造を有するナノメートルサイズの結晶性不良なリン酸カルシウムで造られている。しかし、骨ミネラルの組成は、 $\text{Ca}/\text{P}$  原子比 1.67 を有する理想的な化学量論的結晶性ヒドロキシアパタイトである  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  と違って、相当に異なっていて、下記式によって表わされ得る：



骨ミネラルの非化学量論は、主に、三価の  $\text{PO}_4^{3-}$ -イオンに代わられる  $\text{CO}_3^{2-}$  や  $\text{HPO}_4^{3-}$  のような二価イオンが存在することによる。 $\text{HPO}_4^{3-}$  や  $\text{CO}_3^{2-}$  イオンによる置換は、 $\text{Ca}/\text{P}$  比の変化を生じ、年齢や骨の場所に応じて 1.50 ～ 1.70 の範囲になり得る  $\text{Ca}/\text{P}$  比を生じる。 $\text{Ca}/\text{P}$  比は、骨の加齢の間に増大するのが普通であり、このことは、骨が古くなる程、カーボネート種の量が増大するのが典型的であることを示唆する。

骨ミネラルの特定の溶解度特性を生じるのは、ナノ結晶サイズ及び結晶性不良な性質と共に  $\text{Ca}/\text{P}$  比である。そして、骨組織は、ミネラル吸収性細胞（破骨細胞）やミネラル産生性細胞（骨芽細胞）によって支配される一定の組織修復を受けることから、ミネラルの溶解度挙動は、これらの細胞活性の間の微妙な代謝バランスを保つのに重要である。

自然の骨ミネラルに精密に似せて造られる合成の骨移植物質は、自然の骨に代わる有用な代替品になることができる。許容される合成の骨は、自生の骨（患



者の自身の骨)の入手可能性や採取の問題並びにウイルス性感染の危険のような異系移植骨(死体からの骨)に伴う危険や合併症の問題を回避することができる。従って、移植片として用いるために自然の骨に精密に似たセラミック物質を合成しようとする試みが相当にあった。ヒドロキシアパタイトは、それが化学量論的であるとはいえ、一般に一層大きな結晶サイズを有する結晶形態が、骨中の自然発生ミネラルに化学的に最も近いことから、好適な選択である。

理想的な合成の骨移植片は、最小限下記の4つの性質を保持すべきである：(1)ヒドロキシアパタイトのように化学的に生物学的適合し得るべきである；(2)移植片を、患者の自身の骨がその回りに癒着するまで、同じ場所にかつ完全にして置くために、構造上の保全性をある程度備えるべきである；(3)患者の自身の骨が外来のヒドロキシアパタイトに取って代わるように、吸収を可能にするために、可溶性形態にすべきである；及び(4)骨形成用骨芽細胞を刺激することができる骨増殖タンパク質のような生体分子を合成の骨物質中に組み込むことが必要になり得ることから、その物質を形成するのに用いられるプロセスを低い温度で行うことが望ましい。(Bone Morphogenetic Proteinsのような)骨増殖タンパク質のほとんどは熱過敏性であり、体温を越える温度においてそれらの生物活性を失う。

これらの要件の達成は、Ca/P比、結晶サイズ、結晶度、多孔度、密度、熱安定性及び物質純度のようなパラメーターが制御される物質によって行われることができる。

従来技術(ニューヨーク、Karger Pub. Co.、Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine、1991においてLeGeros R. Z.)は、ヒドロキシアパタイトの高結晶性形態が、溶液沈殿の後に高い温度(800°～1200℃)で焼結することによって製造されることを教示している。高温処理は、結晶サイズが数ミクロン程度で、Ca/P原子比1.67を有する極めて化学量論的なヒドロキシアパタイトを生じる。そのような高結晶性ヒドロキシアパタイトは、宿主組織に本質的に不溶性にさせる極めて小さい溶解度を有する。従って、それは生骨組

織によって取って代わられず、患者内で望ましくない程に長期にわたる期間無傷のままである。

従来技術は、更に、ヒドロキシアパタイトが、初晶性リン酸カルシウム反応体の固体状態酸-塩基反応によって製造されることを教示している。そのようなアプローチは、時には反応不良で、均質でなくかつ結晶性ヒドロキシアパタイトを有意の含量で有する物質を生じる。

C o n s t a n t z は、米国特許第4, 880, 610号において、高濃厚な濃リン酸とカルシウム源とを塩基及びヒドロキシアパタイト結晶の存在において反応させることによってリン酸カルシウムミネラルを製造することを報告している。生成した生成物は、結晶形態のヒドロキシアパタイトミネラルを含有する多結晶質の物質である。同様に、C o n s t a n t z 等に係る米国特許第5, 053, 212号は、酸/塩基混合物の作業性及び混合性を向上させるために粉末酸源を使用することを開示しているが、米国特許第4, 880, 610号と同様の混合相リン酸カルシウム物質が報告されている。最近になって、C o n s t a n t z 等は、S c i e n c e (267巻、1796～9頁(1995年3月24日))において、リン酸-カルシウム1水和物、ベータトリカルシウムホスフェート、アルファトリカルシウムホスフェート及び炭酸カルシウムをリン酸ナトリウム溶液中で反応させてリン酸カルシウム物質をもたらすことから炭酸塩化されたアパタイトを形成することを報告したが、得られたリン酸カルシウム物質は、依然、自然発生の骨ミネラルに比べて、性質が実質的に一層結晶性である。

同様に、B r o w n 等は、米国再発行特許第33, 221号において、結晶性リン酸二カルシウム(C a / P 比2.0)と酸性リン酸カルシウムとを反応させることを報告している。L i u 等は、米国特許第5, 149, 368号において、結晶性リン酸カルシウム塩と酸性クエン酸塩とを反応させることを開示している。

これらの従来技術の参考文献は、すべてリン酸カルシウムの結晶性固体を反応させることによって得られた結晶性形態のヒドロキシアパタイト固体を生じる化学反応を開示している。非晶質のリン酸カルシウム(C a / P 比1.5)を反応

体の一つとして用いることは、ほとんど報告されていない、というのは、非晶質のリン酸カルシウムは、リン酸カルシウムの中で最も考えられない固体でありかつ慣用の非晶質のリン酸カルシウムは、大部分は不活性でありかつ非反応性固体であると考えられるからである。

従来技術における非晶質のリン酸カルシウム物質の唯一の言及は、非晶質のリン酸カルシウムを、高結晶性ヒドロキシアパタイト化合物を通常高い温度処理下で形成する直接のプリカーサーとして用いることに焦点を合わせてきた。そのような高結晶性物質は、生理学的条件下で極めて不溶性であることから、合成骨用には不適當である。

例えば、P a l m e r等は、米国特許第4, 849, 193号において、酸性リン酸カルシウム溶液を水酸化カルシウム溶液と、両方の溶液を飽和に近くして、非晶質ヒドロキシアパタイト沈殿粉末を形成するように反応させることによって結晶性ヒドロキシアパタイト粉末を形成することを報告している。次いで、非晶質粉末を直ぐに乾燥させかつ700°～1100℃の高い温度で焼結して極めて高い結晶性のヒドロキシアパタイトを得ている。B r o w n等は、米国再発行特許第33, 221号において、特にリン酸四カルシウム(C a / P比2.0)に制限する非晶質相と一層酸性のリン酸カルシウムの内の少なくとも一種とを反応させることによって歯科用セメント用の結晶性ヒドロキシアパタイトを形成することを報告している。更に、B r o w n等は、そのような非晶質状態のリン酸四カルシウムの製法又は性質を開示していない。T u n gは、米国特許第5, 037, 639号において、標準の非晶質リン酸カルシウムペーストを、歯を再ミネラル化するために使用及び適用することを開示している。T u n gは、標準の不活性な非晶質リン酸カルシウムを、チューインガム、口すすぎ用水又は練り歯磨きに混合しかつそれらを通して送達させるのに使用することを提案しており、該非晶質リン酸カルシウムは、口液に入る際に、結晶性フルオリド含有ヒドロキシアパタイトに転化し、これは歯エナメルを再ミネラル化するのに有用である。S i m k i s sは、P C T / G B 93 / 01519において、M gイオン又はピロホスフェートのようなインヒビターを、非晶質のリン酸カルシウムに混合して、生組織中に移植するのに用いることを記載している。非晶質のカルシウムマ

マグネシウムホスフェートは、例えばMgイオンを周囲の身体液中に浸出させる際に、転化して結晶性ヒドロキシアパタイトになる。

骨中の自然発生ミネラルの性質に一層よく似た新規な合成の骨物質を開発する必要がある。特に、低い温度で形成することができる、完全に生物吸収性の、結晶性不良な、ナノメートルサイズの結晶である合成の骨物質を提供する必要がある。

#### 発明の要約

本発明の目的は、生物吸収可能な骨代用物質を提供するにある。

本発明の更に別の目的は、低い温度で形成することができ及び容易に成形可能でありかつ注入可能な骨代用物質を提供するにある。

本発明のそれ以上の目的は、自然発生ミネラルに匹敵し得るCa/P比を有するナノサイズの、結晶性不良なヒドロキシアパタイト固体を形成するにある。

本発明の目的は、標準の不活性な非晶質リン酸カルシウムを反応性の非晶質リン酸カルシウムに転化する方法を提供するにある。

本発明の目的は、自然発生の骨ミネラルの表面反応性に似た表面特性を有する反応性の非晶質リン酸カルシウムを提供するにある。

本発明の更に別の目的は、結晶性不良なヒドロキシアパタイトを低い温度（体温の37℃で）で形成することができる反応性の非晶質リン酸カルシウムを提供するにある。

本発明のなおそれ以上の目的は、注入可能なリン酸カルシウム混合物を提供するにある。

本発明の一態様では、反応性の非晶質リン酸カルシウムを得る方法を提供する。反応性の非晶質リン酸カルシウムは、非晶質リン酸カルシウムを得るように、カルシウムイオン、ホスフェートイオン及び第三イオンを反応させ、次いで反応性の非晶質リン酸カルシウムを得るように、第三イオンの少なくとも一部を除くことによって調製してもよい。

本明細書で用いる通りの「非晶質」なる用語は、有意の非晶質特性を有する物質を意味する。有意の非晶質特性は、75%よりも大きい非晶質含量、好ましく

は90%よりも大きい非晶質含量を意図し、広い特徴のないX線回折図を特徴とする。物質に結晶度が小さい度合いで存在してもよいことが認識されるが、発明の非晶質成分の場合、そのような結晶度は、生成物である結晶性不良なヒドロキシアパタイト性リン酸カルシウムにおいて所望される度合の結晶度よりも大きくならないことが期待される。

”反応性”とは、本明細書中、本発明の非晶質リン酸カルシウムと他のリン酸カルシウムとの反応性を言うのに用いる。反応性は、リン酸カルシウム又は結晶化プロモーターの存在において非晶質リン酸カルシウムが37℃において5時間よりも短い時間で硬化し、実質的に約1～5時間で硬化することができることを特徴とする。反応の完全性、反応の速度、生成した生成物の均質性及び別のようにならぬ化合物と反応することができることは、発明の反応性ACPの特性を示すものである。

発明の別の態様は、非晶質特性を少なくとも90%有しかつ37℃の水中で二リン酸二カルシウムとの混合物として1:1で調製した場合に、混合物は約10～約60分内で硬化することを特徴とする反応性の非晶質リン酸カルシウムを含む。発明は、また、非晶質リン酸カルシウムのカーボネートプレー成分を、プレー成分を熱分解してガス状又はベーパー状副生物とすることによって除くことによって得られる反応性の非晶質リン酸カルシウムも含む。発明は、尚更に、非晶質リン酸カルシウムの変化しやすい成分を、成分を熱分解してガス状又はベーパー状副生物とすることによって除くことによって得られる、反応性の非晶質リン酸カルシウムを含む。発明は、尚一層更に、非晶質特性を少なくとも90%有しかつ37℃の水中で二リン酸二カルシウムとの混合物として1:1で調製した場合に、反応は約75分内、好ましくは40分内で実質的に完全な混合物になることを特徴とする反応性の非晶質リン酸カルシウム物質を含む。

発明の別の態様では、発明の反応性の非晶質リン酸カルシウムを第二のリン酸カルシウムと反応させる結晶性不良なヒドロキシアパタイトを製造する方法を提供する。第二のリン酸カルシウムと反応性の非晶質リン酸カルシウムとを、ヒドロキシアパタイト性リン酸カルシウムを形成する割合いで混合する。

発明の別の態様では、発明の反応性の非晶質リン酸カルシウムをプロモーターと反応させる結晶性不良なヒドロキシアパタイトを製造する方法を提供する。プロモーターは、反応性の非晶質リン酸カルシウムをヒドロキシアパタイト性リン酸カルシウムに転化させるように選ぶ。

発明の別の態様は、実質的に図7dに示す通りのX線回折図を有する結晶性不良なヒドロキシアパタイトを含む吸収可能な骨代用物質を含む。発明は、また、 $2\theta$ 値 $26^\circ$ 、 $28.5^\circ$ 、 $32^\circ$ 及び $33^\circ$ に広いピークを含むX線回折図を有する結晶性不良なヒドロキシアパタイトを含む吸収可能な骨代用物質も含む。発明は、更に、ラット筋肉内部位に入れた際に、骨代用物質の少なくとも100mg、好ましくは300mgの吸収が、1カ月以内に完了することを特徴とする結晶性不良なヒドロキシアパタイトを含む吸収可能な骨代用物質を含む。

吸収可能な骨代用物質は、更に、非晶質リン酸カルシウムと第二ホスフェートとを流体中で反応させることから調製する際に、反応混合物は約 $22^\circ\text{C}$ において60分よりも長い時間の後に硬化し、かつ反応混合物は $37^\circ\text{C}$ において約10～約60分以内に硬化することを特徴とする。好適な実施態様では、混合物は、約 $22^\circ\text{C}$ において約60分よりも長い時間の間注入可能である。その他の好適な実施態様では、混合物は、約 $22^\circ\text{C}$ において約60分よりも長い時間の間成形可能である。

発明の別の態様は、吸収可能な骨代用物質として使用するのに適した成形可能なペーストを含む。ペーストは、発明の反応性の非晶質リン酸カルシウムと、第二リン酸カルシウム粉末との混合物及び所望のコンシステンシーをもたらす程の量の流体を含み、該混合物は、約 $22^\circ\text{C}$ で硬化することができる。

発明のペーストは、また、発明の反応性の非晶質リン酸カルシウムと、プロモーターとの混合物及び所望のコンシステンシーをもたらす程の量の流体を含むことができ、プロモーターは、反応性の非晶質リン酸カルシウムをヒドロキシアパタイト性リン酸カルシウムに転化させるように選び、該混合物は、約 $22^\circ\text{C}$ で硬化することができる。好適な実施態様では、混合物は、約 $22^\circ\text{C}$ において60分よりも長い時間の後に硬化し、かつ混合物は約 $37^\circ\text{C}$ において約10～約60分以内に硬化する。

### 図面の簡単な説明

発明の説明を、下記の図を参照して行う：

図1は、比較的に不明瞭な境界を有しかつ一部形のない形態（矢印）で浸漬されたクラスター内のナノメートルサイズのグレインを例示する反応性の非晶質リン酸カルシウムの高分解能の透過型電子顕微鏡写真である；

図2は、本発明の反応性の非晶質リン酸カルシウムの、加熱工程（a）前及び（b）後の赤外スペクトルである。熱処理した後にH-O-H基（ $\sim 3,550\text{ cm}^{-1}$ 及び $1,640\text{ cm}^{-1}$ ）及び $\text{CO}_3^{2-}$ 基（ $1420-1450\text{ cm}^{-1}$ ）の消失に留意すること；

図3は、本発明の反応性の非晶質リン酸カルシウムの、真空加熱工程（a）前及び（b）後のX線回折図である。その物質は、真空加熱処理した後に非晶質状態が保存されていることを示している。それは、回折角 $20^\circ \sim 35^\circ$ の間に鋭いピーク及び広い最大が存在しないことを特徴とする。固体の非晶質状態は、本発明のプロセス全体にわたって保たれる；

図4は、真空加熱手順後に、 $1.58$ である $\text{Ca}/\text{P}$ を生じた本発明の反応性の非晶質リン酸カルシウムのエネルギー分散型電子マイクロプローブスペクトルである；

図5は、本発明の非晶質リン酸カルシウムから誘導される結晶性不良なヒドロキシアパタイト生成物の、結晶性ヒドロキシアパタイトに比べた場合の溶解度カーブである。 $37^\circ\text{C}$ の溶液中に放出されるカルシウムイオンの量によって測定する通りの、本発明の物質の溶解度が、一層結晶性の形態のヒドロキシアパタイトに対して相対的に一層大きいことに留意すること；

図6は、発明の骨代用物質を形成する反応において用いる（a）反応性の非晶質リン酸カルシウム；及び（b）二リン酸二カルシウムのX線回折図である；

図7 a-dは、本発明の骨代用物質を形成するための反応性の非晶質リン酸カルシウムと二リン酸二カルシウムとの混合物の反応の進行を追跡するX線回折図である；

図8は、（a）リン酸二カルシウム2水和物、（b）発明の活性化されたACP、及び（c）本発明の結晶性不良なHAの赤外スペクトルである；及び

図9は、自然発生 of 骨のX線回折図である。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、骨の疾患及び損傷を治療するための骨代用物質（BSM）並びに吸収可能なリン酸カルシウムを要求するその他の生物学的用途として有用な完全に吸収可能なかつ再骨化用の結晶性不良なヒドロキシアパタイト（HA）を提供する。発明の結晶性不良なHAは、その生物学的吸収性及びその最小の結晶度を特徴とする。それは、高度に多孔性で急速に吸収可能でも、或は多孔度を小さくしてゆっくり吸収可能にしてもよい。その結晶度特性は、自然の骨と実質的に同じであり、一層高い結晶度は、当分野に知られている骨代用物質に見られる一層高い結晶度を有しない。発明の結晶性不良なHAは、また、生物学的適合性であり、宿主に有害でない。

発明の重要な態様では、結晶性不良なHAを外科的な植え付けにおいて用いることの容易性は、当分野に知られているその他の骨代用物質に比べて相当に向上される。特に、反応は体外で開始され、室温においてゆっくり進行し、それによりその物質が外科部位に適用する前に「固まって」使用できなくなる可能性を最小にする。反応は体温において加速され、その物質は正しい場所で硬化する。その上に、結晶性不良なHAのコンシステンシー及び成形適性並びに反応速度は、治療要求に従い、簡単なパラメーターを少し変更することによって変えることができる。

本発明の骨代用物質の吸収性は、その多孔性と有意の非晶質性との組合せに起因し得る。発明の骨代用物質は、自然の骨に認められるのと実質的に同様な結晶性不良なヒドロキシアパタイト性リン酸カルシウムを含む。アパタイトに結晶性が不足していることは、他の一層結晶性の種に比べて水性系への溶解度が幾分増大することに関連付けられ、これより低結晶度及び／又は安定な非晶質性アパタイト性領域が存在することは、生物学的系への吸収性を促進するものと考えられる。多孔度は、細胞及び細胞プロセスの骨代用物質マトリックス中への浸透並びに物質のマトリックス内部への及びマトリックス内部からの拡散の両方を助成する。従って、多孔度の一層小さい骨代用物質は、多孔度の大きいものに比べてイ



ンビボで吸収されるのが一層遅くなる。

好適な実施態様では、反応体を体外で混合し、外科部位に適用するのに適した成形適性な骨代用物質を生じる。その反応は、通常、外科部位に適用した後に完結される。発明の骨代用物質は、通常5時間よりも短い時間で硬化し、生理学的条件下で実質的に約1～5時間で、好ましくは約10～30分で硬化する。好適な実施態様では、反応を、蒸留水を2つの乾燥成分の混合物に加えることによって開始させて約30分で硬化する濃厚なペーストを形成する。蒸留水の代わりに、血清又は組織培地のようなその他の水性剤を使用してよい。生成した吸収可能な結晶性不良なヒドロキシアパタイトがカルシウム不足になることは最もしばしばあり、カルシウム対ホスフェート比は、ヒドロキシアパタイトについて理想的な化学量論値のおよそ1.67に比べて、1.5よりも小さくなる。

発明は、また、適した反応性骨代用物質及び反応性プリカーサーを識別するテストも提供する。そのテストは、成分を組み合わせ、成形可能な物質を製造し、それが体温又はその付近で適した量の時間で硬化する能力を明らかにすることを含む。このようにして硬化する成分を、次いでテスト動物の筋肉内に入れて生物学的吸収性を調べてもよい。本発明の骨代用物質100ミリグラム(mg)、好ましくは300ミリグラム(mg)が、ラット筋肉に1ヵ月よりも短い期間で吸収されることになる。吸収の一層遅い骨代用物質のいくらかは、齧歯動物に完全に吸収されるのに1年よりも長い期間を要し得る。

骨代用物質形成反応は、少なくとも一種の非晶質リン酸カルシウム(ACP)プリカーサーを用い、活性化されたACPを用いるのが好ましい。反応が、管理された様式で一部又は全部が発明の結晶性不良なHA(骨代用物質)に転化されるプリカーサーACPを一種だけ用いてよい例がいくつかある。別法として、反応は、ACPと組み合わさって発明の結晶性不良なヒドロキシアパタイトを生じる更なるプリカーサーを一種又はそれ以上、好ましくはカルシウム及び／又はホスフェート源を用いてよい。何にしても、体外で開始させ、ペースト様形状で続行させることができかつ37℃で有意に加速されて硬化されたリン酸カルシウム生成物に至る反応は、極めて好適である。

ACPプリカーサーだけ：非晶質リン酸カルシウムを単独のプリカーサーとし

て用いて吸収可能な骨代用物質を製造する場合に、ACPが転化して高結晶性ヒドロキシアパタイトになる自然の傾向を調節することが重要である。他方で、転化の時間経過は、外科的使用効果を有する程に速くすべきである。一つのアプローチは、結晶形成のインヒビターを含有するプリカーサーACP（例えば、例1のACP）を、結晶形成のインヒビターを含有しないACP（例えば、プロモーター）と組み合わせることである。反応体を、適した粒子寸法及びインヒビター含有ACPを過剰にして、乾燥状態で混合してもよい。反応体を、次いで、水を添加するような結晶形成条件に、次いで体中に導入した後に起きるような昇温に暴露させて反応体を発明の結晶性不良なHAに転化させることができる。

ACPプリカーサー+更なるリン酸カルシウム源：ACPを、任意の反応助成技術を用いて第二カルシウム源（第二ACPを含む）と反応させてもよい。助成する反応は、非晶質リン酸カルシウムをナノ結晶性又は結晶性不良なヒドロキシアパタイトに転化させることである。そのような反応は、酸/塩基、変位、置換、及び加水分解反応並びに純粋に物理的な及び機械的な反応（例えば、粉碎、混合）を含む。任意の反応スキーム下で、ACPは、反応全体にわたって有意の非晶質性を保持することが重要である。特には、出発生成物内の総括的結晶度は、最終生成物において所望される総括的結晶度を越えることができない。これより、所定の反応スキームは、反応期間全体にわたってACPの非晶質性を安定化することを要し得る。当分野に知られているそのような適した結晶形成のインヒビターの例は、カーボネート、フルオリド、及びマグネシウムを含む。

本発明の多数の態様では、プリカーサーの内の少なくとも一つを、他の成分と生理学的条件で反応させるように、活性にしなければならない。いくつかの好適な実施態様では、ACP成分を、第二のカルシウム含有反応体との反応を助成するために、加熱下で活性にする。そのような適した第二反応体の例は、DCPD、その他の結晶性又は結晶性不良なリン酸カルシウム、カルシウム源又はホスフェート源、或は第二のACPを含む。触媒作用又はイオン性溶媒の使用のような当分野に知られているその他の活性化方法もまた、置換基の間の反応を助成するのに用いてもよい。第二のリン酸カルシウム反応体は、任意の結晶構造のものがよく、第一のACPと、直接か又はイオン性溶媒のような反応助成用ビヒクルを

使用することによるかのいずれかで反応性になるように選ぶべきである。適した反応条件は、反応体を混合しかつ水を添加した後に、37℃で急速に硬化することを明らかにすることによって決めることになる。

骨代用物質形成反応は、また、多孔質の最終生成物を生成するようにデザインしてもよい。一実施態様では、酸／塩基ケミストリーの原理＋管理された粒径の反応体の乾燥混合物を使用することが、多孔質の骨代用物質に至る。化学的又は物理的エッチングや浸出のような多孔質を助成するその他の方法を採用してもよい。

本発明は、標準の不活性な非晶質リン酸カルシウム沈殿を高反応性の非晶質固体に転化する新規な方法を提供する。非晶質固体を上記の反応において用いて生物学的活性、生物学的吸収性及び構造上の保全性を備えた結晶性不良な又はナノ結晶性の合成ヒドロキシアパタイトを形成することができる。この新規な物質を他のリン酸カルシウムと37℃又はそれよりも低い温度で反応させて結晶性不良なヒドロキシアパタイトからなる骨様物質を形成することができる。

本発明の非晶質リン酸カルシウムは、他の酸性又は塩基性リン酸カルシウムの方向に極めて反応性である。また、本発明の非晶質リン酸カルシウムは、それが、従来ACPに対して「不活性」と考えられる種々のカルシウム又はリン保持化合物、例えばCaO、CaCO<sub>3</sub>及び酢酸カルシウムと室温において反応することができる点で、反応性と考えられる。慣用の結晶性リン酸カルシウムの従来技術の酸－塩基反応は、反応不良な固体を生じ、これらは、あまりに結晶性で生組織に十分に溶解することができない反応生成物を有する。従来技術からの反応は、通常不完全であり、反応生成物は均質でない。対照して、本発明の非晶質リン酸カルシウムは、広範囲のリン酸カルシウム及びその他のカルシウム又はリン保持物質と急速にかつ完全に反応して均質な生成物を供する。

高められる反応性の源は、完全には理解されない；しかし、それは、本発明のプロセスによって造られる通りの、非晶質性（結晶性の欠如）及びいくつかの実施態様では、部位空孔に関連するものと考えられる。空孔は、続く反応のための部位を供し得る。これらの観察は、以下に一層完全に検討することにする。

本発明の方法は、1000Åよりも小さい、好ましくは200～500Å、最

も好ましくは300Åの非晶質リン酸カルシウム粒子の初期形成を可能にし、それらのそれ以上の成長は、溶液からの生成物の急速な沈殿によって終結される。カルシウム及びホスフェートイオンを反応させて非晶質リン酸カルシウムを形成する間、第三イオンを溶液中に導入し、それでこれらのイオンを、三価の $\text{PO}_4^{3-}$ 基の代わりに非晶質の沈殿構造に組み込むようにする。いくらかの $\text{PO}_4^{3-}$ が第三イオンに取り替えられることから、総括の $\text{PO}_4^{3-}$ は減少し、こうして非晶質沈殿のCa/P比を増大させ（標準の非晶質リン酸カルシウムに比べて）かつリン酸カルシウムの原子価又は電荷状態を変更させる。非晶質固体を、次いで急速に凍結乾燥させてその物質の化学的及び物理的性質を保存してもよい。非晶質固体を、次いで第三イオンの少なくともいくらかを除くのを助成するのに選ぶ特定の条件下で処理してもよい。カーボネートの場合では、特定の温度及び圧力条件は、非晶質性を保ちながら、恐らく非晶質固体からガス状二酸化炭素及び酸素として、全炭素を減少させるに至る。

生成した物質は、過去において一般に1.50であると報告されている非晶質リン酸カルシウムにおいて典型的に認められるよりも大きなCa/P比を有する非晶質固体である。更に、その物質から炭素を除くと、非晶質固体内の侵入型構造に空孔を生じ、それを極めて反応性の固体にさせる。それらは、いくつかの可能な空孔源になり得る。その物質は、表面積を増大させるような種々の手段によって反応性を促進する多孔性を保有する。その物質は、また、第三イオンを除く際に、化学量論バランスの変化も受け得る。この化学量論変化は、電荷不均衡を生じ得、これは、非晶質リン酸カルシウムの反応性の増大の原因になる。

プロセス全体にわたってその物質の非晶質性を保つことが望ましい。プロセスの間に又は最終生成物において、結晶性を全体として（単一の結晶性領域）又は局部領域（微結晶性領域）においてさえ導入するならば、固体はその反応性を失うことが分かった。生成した高反応性のリン酸カルシウムは、性質が非晶質でありかつカルシウム対三価リン比1.55～1.65の範囲を有する。好適な実施態様では、非晶質リン酸カルシウムは、Ca/P比約1.58を有する。

非晶質状態は、沈殿プロセスの速度及び期間を調節することによって引き起される。本発明の非晶質ヒドロキシアパタイトは、初期の沈殿が急速な条件下で溶

液から沈殿される。急速な沈殿は、極めて小さいリン酸カルシウム核を多数形成することになる。加えて、急速な結晶又はグレイン成長は、各々のグレイン内に欠陥を一層生じるに至り、それによりまた溶解度を増大させる。スペクトルの一番端において、結晶又はグレイン成長は非常に急速でありかつ欠陥密度は非常に有意であるので非晶質リン酸カルシウムが生じる。非晶質リン酸カルシウムはゲル様であり、変動組成を有する固溶体を含む。これらのゲルは、もはやレンジ構造を持たず、オングストロームスケールで測定した場合に均質である。これらの非晶質化合物は、生理学的条件下で高い溶解度、高い成形レート及び結晶性不良なヒドロキシアパタイトへの高い転化レートを有する。

この方法によって得られる非晶質リン酸カルシウム固体は、最終反応中に導入する程に長い期間実質的に非晶質の固体としてそれらの非晶質性を十分に保持する。それらは、また、ホスフェートを含有する他の固体又は溶液と混合しかつ反応させてナノメートルサイズの結晶を均一な分布で含有する固体を得ることもできる。更に好適な実施態様では、非晶質リン酸カルシウムは他の固体と完全に反応することから、生成する固体の $\text{Ca}/\text{P}$ は、そのような反応から全カルシウム及び三価リンを構成することになる、すなわち本質的に完全な反応が存在することになる。溶液又は固体からの適当なモル濃度のホスフェートを新規な非晶質リン酸カルシウム物質と反応させる場合に、結晶性不良なヒドロキシアパタイト物質( $\text{Ca}/\text{P}$  1.1～1.9)が得られる。これより、本発明は、生成する生成物の化学的組成をデザイン及び変更することを可能にし、それにより骨移植物質として使用する最終生成物の生物学的活性を調節するそれ以上のモードを提供する。

本発明の一実施態様では、カルシウム及びホスフェートイオン並びに第三イオンを、リン酸カルシウムの急速な核形成及び沈殿を助成することになる濃度、 $\text{pH}$ 及び温度で含有する溶液を調製する。沈殿が十分に急速である場合に、非晶質のゲル様リン酸カルシウムが形成される。ヒドロキシアパタイトの熱力学的に有利な結晶性形態は、反応の速度を低減させることによって増進されることから、非晶質化合物を確実に得るために、反応の速度を増大させる所定の加工工程を採用してもよい。本発明の非晶質リン酸カルシウムを急速に沈殿させるための溶液

をデザインする場合に、下記のファクターを取り分け考慮すべきである。

好適な条件：カルシウム及びホスフェート源を急速に混合して反応の速度を増大させる。不安定相の方を生成物として好むために、反応の速度を増大させる。イオンの各々について一層の反応時間を正確に並置させて固体を形成すると、一層熱力学的に有利な結晶性及び安定な構造を生じることになる。

好適なカルシウム及びホスフェート源：高濃厚な又は近過飽和の溶液を使用すると、一層急速な反応が起きるのを確実にする。

好適な温度：反応は、室温で行うことができるが、一反応体の濃度を増大させるために沸点に近い温度にすることは、反応の速度を増大させることの可能な手段である。

一実施態様では、カルシウムイオン、ホスフェートイオン及びカーボネートイオンの水溶液を一緒にして迅速に混合してカーボネート含有非晶質リン酸カルシウム固体を得る。イオンの相対濃度は、所望のCa/P比を有する沈殿をもたらすように選ぶ。カーボネートイオンは、非晶質リン酸カルシウムにおけるホスフェートイオンに置換する。炭酸塩化された非晶質リン酸カルシウムは、カーボネート水溶液から沈殿によって得てもよい。適したカーボネート水溶液は、単に例として、バイカーボネート溶液、炭酸ナトリウム溶液、炭酸カリウム溶液を含む。更に、非水性溶液を使用することは、発明の範囲内として意図する。

炭酸塩化された物質を使用することは、それが $\text{PO}_4^{3-}$ を $\text{CO}_3^{2-}$ で置換することによってCa/P比の調節を可能にすることから、望ましい。加えて、 $\text{CO}_3^{2-}$ の存在は、非晶質リン酸カルシウムにおいて結晶性の発現を遅延させることが知られている。しかし、Ca/P比を変更する際に及び反応性部位空孔を非晶質リン酸カルシウム中に導入する際に、カーボネートの代わりに又はカーボネートに加えて、単に例として、ニトレート、ニトリット、アセテート、 $\text{Mg}^{+2}$ 及び $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ イオンのようなその他のイオン又はイオンの混合物が適し得ることが認められる。

非晶質リン酸カルシウム沈殿を捕集しかつろ過した後に活性化してもよい。この工程を、捕集された沈殿の非晶質状態を保存するように、冷蔵庫中で又は周囲以下の温度で行うのが好適である。捕集は、典型的には、重力ろ過、真空ろ過又

は遠心分離を含み、これらに限定しない任意の慣用の手段によって行うことができる。捕集された沈殿はゼラチン状であり、蒸留水で1回以上洗浄する。

洗浄した沈殿を、物質の非晶質性を保つ任意の条件下で乾燥させる。凍結乾燥が適しているが、唯一の技術ではない。凍結する際、沈殿は凍結させたまま、乾燥させて同伴される液の大部分を除く。この手順は、凍結された沈殿を真空チャンバーの中に所定の時間入れることによって行ってもよい。凍結乾燥は、液体窒素温度で12～78時間の範囲の時間、好ましくは約24時間かつ $10^{-1} \sim 10^{-4}$ トルの範囲の真空、好ましくは $10^{-2}$ トルの真空下で行われるのが典型的である。凍結乾燥において典型的に用いられる極低温は、物質のそれ以上の結晶化を抑制することから、好適な方法は凍結乾燥を含む。その結果、それによって得られた非晶質リン酸カルシウムは、極めて微細な自由流動性の粉末である。

凍結させたACPを、次いで活性化してもよい。カーボネートがACP中に存在する好適な実施態様では、ACP粉末を加熱して残留する自由水、水和水を駆逐しかつ炭素を、恐らく $\text{CO}_3^{2-}$ を分解して $\text{CO}_2$ 及び酸素にすることによって除く。加熱工程は、非晶質リン酸カルシウムの結晶性ヒドロキシアパタイトへの転化を防ぐように、 $500^\circ\text{C}$ よりも低い、 $425^\circ\text{C}$ よりも高い温度で行う。加熱は、温度 $450^\circ \sim 460^\circ\text{C}$ の範囲で行うのが好ましい。好適な実施態様では、凍結乾燥させた非晶質リン酸カルシウム粉末を減圧下で加熱する。減圧環境では、同じ結果を得るのに、温度を相当に低く、すなわち約 $175^\circ \sim 225^\circ\text{C}$ の範囲にすることができる。温度を低くすることは、非晶質粉末の結晶化の危険性を低減させることから、望ましくなり得る。

低結晶度及び部位空孔（多孔性及び／又は化学量論的变化）は、本発明の非晶質リン酸カルシウムの反応性が高くなることが観測されることの理由を説明し得る。これは、下記の観測によって実証される。 $525^\circ\text{C}$ に加熱したカーボネート含有非晶質リン酸カルシウムは、結晶性ヒドロキシアパタイトの形成の増大を有しかつ対応して反応性の低下を有することが観測される。ほんの $400^\circ\text{C}$ に加熱した非晶質リン酸カルシウムは、非晶質性を保持するが、反応性の低下を示す。恐らく、この反応性の低下は、この低い温度で処理したサンプルにおいてIRに

よって観測される一層高いカーボネートレベル（及び一層少ない部位空孔）に関連する。これは、非晶質性及び減少した炭素含量（空位の反応性部位）が反応性のファクターになることを示唆している。これは、決して反応性についての唯一の基準であることを意図しない。観測される反応性についてのその他の基準は、発明の範囲内であると考ええる。生成した非晶質リン酸カルシウム粉末は、 $\text{Ca}/\text{P}$ 比1.1～1.9、好ましくは約1.55～1.65、最も好ましくは約1.58を有する高反応性の非晶質リン酸カルシウム物質である。その粉末を、種々の分析技術によって特性表示した。

図1に、本発明の好適な反応性非晶質リン酸カルシウムの形態学的特性及びオングストロームサイズの性質を例示するために、高分解能の透過型電子顕微鏡写真を示す。好適な粒径は、1,000 Åよりも小さく、好ましく300～400 Åの範囲である。結晶性物質に対照して、明瞭なエッジ及び表面を欠く、小球様

クラスターを分離する不明瞭な境界に注目すること。図2a及び2bは、凍結乾燥プロセスの後（a）及び次いで450℃で1時間熱処理した後（b）の非晶質リン酸カルシウムの赤外スペクトルを例示する。物質中に局所化学基が存在することを例示する赤外ピークは、 $\text{H}-\text{O}-\text{H}$ 基（およそ3,400  $\text{cm}^{-1}$ 及び1,640  $\text{cm}^{-1}$ に）及び $\text{CO}_3^{2-}$ 基（1420～1450  $\text{cm}^{-1}$ に）の存在が、熱処理した後に相当に低減されることを示す。しかし、同様の物質の図3におけるX線回折図は、凍結乾燥した後の非晶質状態（a）が、熱処理した後（b）に実質的に不変であることを示す。本発明の非晶質性は、既知の結晶性リン酸カルシウムに一致する回折角の任意の位置に鋭いピークの存在しない広いピーク及び漠然としたバックグラウンドによって特性表示される。波長分散型X線分析を、熱処理した後の同じ物質の電子マイクロプローブに関して用いて行う $\text{Ca}/\text{P}$ 測定は、1.58である $\text{Ca}/\text{P}$ を生じる（図4）。

これらの特性表示は、非晶質リン酸カルシウム固体における所定の基の局所部分に変化があっても、総括の非晶質性はプロセス全体を通して維持されることを立証する。これより、物質の判定を、ACPを活性化し得る局所部位又は「孔」を非晶質構造中に含有すると認める。



別の好適な実施態様では、高反応性の非晶質リン酸カルシウムに酸性又は塩基性リン酸カルシウムを反応させて結晶性不良なヒドロキシアパタイトを得る。先に検討した通りに、ヒドロキシアパタイトは熱力学的に好適な反応生成物で、容易に結晶化して、生理学的条件下で不溶性であることにより、生物学的適合性でない生成物をもたらす。有意に結晶化しないで、急速かつ完全に反応して生成物ヒドロキシアパタイトになることができる非晶質リン酸カルシウムを使用することは、生理学的条件下で吸収可能な結晶性不良なヒドロキシアパタイトへの新規なルートを提供する。

本発明の非晶質リン酸カルシウム粉末に種々の第二成分を混合物し、それにより反応させて結晶性不良な形態のヒドロキシアパタイトを形成してもよい。この反応は、粉末を種々の酸性及び塩基性の両方のリン酸カルシウムと、水、塩水、緩衝溶液、血清又は組織培地のような、しかしこれらに限定されない流体の存在において混合する際に、室温で起きる。本発明の非晶質リン酸カルシウムと酸性

リン酸カルシウムとの混合物は、加える流体の量に応じて、種々の度合のペーストコンシステンシーを有する極めて成形適性な及び／又は極めて注入適性なペーストを生じる。

適当なリン酸カルシウムは、ヒドロキシアパタイト性リン酸カルシウムを得る反応について適当な化学量論を供する酸性及び塩基性の両方のリン酸カルシウムを含む。好適な実施態様では、酸性（ $\text{pH} 5 \sim 7$ ）リン酸カルシウムを用いる。適した酸性リン酸カルシウムは、下記を含み、これらにいささかも限定されない：メタリン酸カルシウム、リン酸二カルシウム2水和物、リン酸七カルシウム、リン酸三カルシウム、ピロリン酸二カルシウム2水和物、結晶性不良なHA、ピロリン酸カルシウム、及びリン酸八カルシウム。適した塩基性リン酸カルシウムは、更なるACPを含む。自然の骨に近い所望のCa/P比を生じるために、単に例として、CaO、CaCO<sub>3</sub>、酢酸カルシウム、及びH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>のようなホスフェート又はカルシウムの源となるその他の固体を混合して最終生成物を形成してもよい。同様に、非晶質又は結晶性不良な状態の第二成分を供するのが望ましいかもしれない。

ヒドロキシアパタイトは、熱力学的に好都合な形態のリン酸カルシウムである。従って、化学的反応なしでACPのHAへの転化を助成する成分を添加することによって、単に反応性ACPの結晶性不良なHAへの転化を助成することは、発明の範囲内である。適したプロモーターは、水及び熱を含み、しかしこれらに限定されない。

第二のリン酸カルシウムは、X線回折図（図6a）において関心のあるリン酸カルシウムを象徴する鋭い回折ピークが存在することによって証明される通りに、結晶性であるのがしばしばである。対照して、反応性のACPは、非晶質でありかつX線回折により識別し得るピークを示さない（図6b）。しかし、二リン酸二カルシウムは、結晶性が一層高いにもかかわらず、反応性のACPとの反応で消費され、生成物HAは、ずっと低い結晶度を有する。

反応体の内の少なくとも一つは、非晶質でありかつ高反応性であることから、反応は、室温で進行して結晶性不良な又は微結晶性ミクロ構造を有するアパタイト性物質を供する。反応は、また、実質的に完全であり、それにより混合物のす

べてのカルシウム及びホスフェートは、生成するヒドロキシアパタイト生成物によって確実に消費される。これは、単に出発の非晶質リン酸カルシウム及び第二リン酸カルシウムの相対割合を選定することによって、信頼し得るヒドロキシアパタイト生成物の信頼し得る製造を可能にする。カルシウム対ホスフェート比約1.2～1.68、好ましくは約1.5よりも小さく、最も好ましくは約1.38を保つのが望ましい。

生成物のヒドロキシアパタイト物質は、自然発生の骨の特性を示す化学変化を起こしやすい環境を含有する。自然発生の骨では、ミネラルはナノメートルサイズの構造を特徴とし、高い表面積を備えて周囲の組織環境と相互作用し、組織の吸収及びリモデリングを生じる。本発明は、生成物としてのそのナノメートルサイズの結晶により、自然発生の骨によく似ている。更に、骨の生組織に認められるミネラル性をシミュレートするために、結晶性やCa/P比のような性質を本発明において厳密にデザインする。

別の好適な実施態様では、骨修復部位に導入することができる注入適性なペー

ストを調製してもよい。そのペーストは、本発明の非晶質リン酸カルシウムと第二成分とを、注入するための所望のコンシステンシーを生じる程の量の水又は緩衝剤中で混合することによって調製するのが普通である。これは、依然16～18ゲージの注入器を通過させることを可能にしながら、できるだけ濃厚にするのが最もしばしばである。その物質は、ペースト中の成分固体が非晶質性であることから、従来技術の組成物に勝る著しく改良された流動特性を有する。生成したペーストの流動特性は、練り歯磨き様であり、他方従来技術の物質は、粒状又はオートミール様コンシステンシーを継承する。ペーストは、室温に保ちかつ気化を最少にするならば、使用する前、幾時間かの期間までに調製してもよい。貯蔵時間は、気化を最少にするための工程を採用しさえすれば、ペーストを冷蔵庫中に1°～10℃の範囲の低い温度に保つことによって伸ばしてもよい。

骨代用物質ペーストの粘度を要求に従い、反応体に加えるべき液体の適当な量を選ぶことによって調整してもよい。ペーストを、注入適性な又は成形適性なコンシステンシーのいずれかで調整してもよい。注入適性なコンシステンシーとは、依然16～18ゲージの針を通過することができながら、できるだけ濃厚である

ことを意味する。これは、「練り歯磨き」様コンシステンシーになるのが最もしばしばである。成形適性とは、物質にその形状を保持させるコンシステンシーを言う。成形適性なコンシステンシーの極端な場合では、ペーストは、ガラスパテ又はコーキングコンパウンドのコンシステンシーを有することになる。ペーストは、また、丁度注入適性及び成形適性の両方にする程の液によって調整してもよい。

いくつかの好適な実施態様（例えば、下記の例9～14）では、反応は、室温でゆっくり起きるが、体温で有意に促進される。反応体を水と混合することによって形成されるペーストは、室温に保ちながら、相当の期間（幾時間かまで）注入適性なままであるので、これは、外科的な場所で特に有用である。これより、ペーストは、室温（約22℃）において、1時間よりも長い時間の後に硬化しかつ10分よりも長い、好ましくは1時間よりも長い、最も好ましくは3時間よりも長い間成形適性及び／又は注入適性なままである。ペーストは、移植部位（約

37℃)に注入した後に、約1時間よりも短い内に、好ましくは約10～30分で硬化する。

発明の別の実施態様では、骨再生用タンパク質(BRP)を非晶質リン酸カルシウム及び酸性リン酸カルシウム混合物中に加入することを意図する。BRPは、骨成長の速度を増大させかつ骨治癒を促進するのが立証された。ナノ結晶性又は結晶性不良なヒドロキシアパタイト及びBRPを含む骨移植片は、本発明のヒドロキシアパタイトを単独で用いる骨移植片に比べて、骨治癒を更に一層速く促進することが期待される。BRPの効能は、ナノ結晶性又は結晶性不良なヒドロキシアパタイトの溶解度を、それがBRP、カルシウム、及びリンを骨成長について最適な用量で送達する速度で溶解するように調節することによって、更に増進される。そのようなBRPを加入する方法は、蒸留水の代わりに、BRPを含有する緩衝溶液をタンパク質活性を維持するその最適なpHで混合することを含み、これに限定されない。BRPの例は、下記を含み、これらにいささかも限定されない: Transforming Growth Factor-Beta、Cell-Attachment Factors、Endothelial Growth Factors、及びBone Morphogenetic

Proteins。そのようなBRPは、現在、マサチューセッツ、ケンブリッジ在のGenetics Institute；カリフォルニア、パロアルト在のGenentech；及びマサチューセッツ、ホプキントン在のCreative Biomoleculesによって開発されている。

発明の別の実施態様では、抗生物質又はその助剤を非晶質リン酸カルシウム及びその混合物中に加入することを意図する。臨床の点から、骨移植外科学から起きる主要な関係の一つは、術後の炎症又は感染を制御したい要求である。結晶性不良なヒドロキシアパタイト及び抗生物質を含む骨移植片は、手術部位における局部感染の機会を減少させ、感染のない、これより一層速い骨治癒プロセスに寄与することが期待される。抗生物質の効能は、結晶性不良なヒドロキシアパタイトの放出を、それが抗生物質ペプチド又はその活性な成分を最も有効な用量で組織修復部位に送達する速度で溶解するように調節することによって、更に増進さ

れる。抗生物質の例は、下記を含み、これらにいささかも限定されない：ペニシリン、クロルテトラサイクリン塩酸塩（オーレオマイシン）、クロラムフェニコール及びオキシテトラサイクリン（テラマイシン）。骨組織修復について最適な条件を助成する際に必要な成分の全部又はほとんどを局所送達するために、抗生物質、大概ポリペプチド及び骨再生用タンパク質の両方を、本発明の結晶性不良なヒドロキシアパタイト物質と混ぜ合わせてもよい。

#### 例

発明を下記の例によって更に例証するが、下記の例は、単に例示するために提示するものであり、発明を制限するものと考えべきでない。

例1. 本例は、比較的の不活性な非晶質リン酸カルシウム固体を本発明の高反応性非晶質リン酸カルシウムにさせるための段階調製及び方法について記載する。

室温で、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ （リン酸ナトリウム）55 g、 $\text{NaOH}$ （水酸化ナトリウム）50 g、 $\text{NaHCO}_3$ （炭酸水素ナトリウム）30 gを蒸留水1.3リットルに急速に溶解することによって、溶液Aを調製した。また、 $\text{H}_2\text{O}$ を0.7～1.3 mlの範囲の容積で用いた。室温で、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ （硝酸カルシウム4水和物）43 gを蒸留水0.5リットルに急速に溶

解することによって、溶液Bを調製した。

次いで、室温で、溶液Bを急速に攪拌する溶液Aに急速に加えることによって、不活性な炭酸塩化された非晶質リン酸カルシウムを調製した。このようにして形成されたゲル様非晶質リン酸カルシウムの沈殿を、直ぐにろ紙（0.05平方m）を使用して並のろ過速度及び約 $10^{-2}$ トルの減圧でろ過した。その物質は薄いケーキを形成し、これを、蒸留水およそ4リットルで、水をろ過用漏斗の中に加えることによって洗浄した。洗浄した物質を、次いでスパチュラを用いて捕集し、かつ2.5 L容器内の液体窒素中に浸漬した。硬い凍結された片を形成した後、容器を真空室の中に24時間（ $10^{-1}$ ～ $10^{-2}$ トル）の間、微細なかつ乾燥した粉末が得られるまで、移した。

上記した手順は、室温で行ってもよいが、全プロセスは、更に非晶質な状態を

一層安定な結晶形態に転化させないように、周囲温度よりも低い温度（ $4^{\circ}\sim 5^{\circ}\text{C}$ ）で行うのが好ましい。更に、結晶性ヒドロキシアパタイト生成のインヒビターとして作用するのが知られているそのような元素又はイオンを、溶液中に微量で加えてもよい。これらは、例えば、 $1.0\text{ g}$ よりも少ない $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ （塩化マグネシウム）の形態の $\text{Mg}$ イオン、 $2\text{ g}$ よりも少ない $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ （ピロリン酸ナトリウム）の形態のピロホスフェートイオンにすることができる。

プロセスのこの点における不活性な非晶質物質の赤外スペクトルを図2aに示す。このスペクトルは、 $\text{P}-\text{O}$ 基（ $600$ 及び $1000\text{ cm}^{-1}$ ）、 $\text{CO}_3^{2-}$ 基（ $1420$ 、 $1450\text{ cm}^{-1}$ ）の特性を示すピークを、 $\text{O}-\text{H}$ 基（ $\sim 3550\text{ cm}^{-1}$ ）の比較的に大きなピークと共に含有する。同じ物質のX線回折図（図3a）は、結晶度の測定を、干渉性ピーク対バックグラウンドの比を取ることにによって求める際に、鋭いピークが存在しないことによって立証される通りに物質の非晶質性を示す。

上記した不活性な非晶質物質を、次いで $450^{\circ}\text{C}$ （ $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ）において60分間加熱することによって、反応性形態に造った。加熱した物質のIRを図2bに示す。このスペクトルは、特定の $\text{O}-\text{H}$ 及び $\text{CO}_3^{2-}$ 基の減少を示し、 $\text{H}_2\text{O}$ 及び $\text{CO}_3^{2-}$ の $\text{CO}_2$ 及び $\text{O}_2$ としての有意の減少を示す。同様に調製したサンプル

では、炭素含量はおよそ60%低下し、全カーボネート比は1.56%から0.5%に減少するのが観測された。しかし、その物質の非晶質性は、このプロセスの間、図3（b）に示すX線回折図によって立証される通りに、失なわれなかった。熱処理した後のこの物質の $\text{Ca}/\text{P}$ 比測定値は、定量的電子マイクロプローブ分析の方法を用いて、1.575であるのが求められた（図4）。非晶質物質の総括的な形態学の及び微細構造の性質を、透過型電子顕微鏡下で見られる通りに、図1に示す。各々のグラニュールを分離する鋭いエッジが存在せず、物質の所定の部分が形のない形態（矢印）を示す、物質の「非晶質な」外観に注目すること。極端に高い比表面積 $120\text{ m}^2/\text{g}$ が、平均細孔サイズおよそ $130\text{ \AA}$ と共に、この物質において観測された。

例2. 調製を上例1に記載する通りにして行ったが、溶液A及びBの調製を下記の反応に代えた。溶液Aは、室温で、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  90.68gを炭酸塩化された蒸留 $\text{H}_2\text{O}$  1.2リットルに急速に溶解することによって、調製した。溶液Bは、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  40.57gを、45容積%の $\text{KOH}$ 溶液24mlを含有する蒸留 $\text{H}_2\text{O}$  1.53リットルに溶解することによって、調製した。この手順から生じた生成物非晶質リン酸カルシウムの化学的及び物理的性質は、例1に従って調製した物質と同様であった。

例3. 調製を上例1に記載する通りにして行ったが、溶液A及びBの調製を下記の反応に代えた。溶液Aは、室温で、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10.58gを、 $\text{NaOH}$ によって調整する通りの9.0よりも大きな $\text{pH}$ の炭酸塩化された蒸留 $\text{H}_2\text{O}$  0.15リットルに急速に溶解することによって、調製した。溶液Bは、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  7.8gを蒸留 $\text{H}_2\text{O}$  0.35リットルに溶解することによって、調製した。この手順から生じた生成物非晶質リン酸カルシウムの化学的及び物理的性質は、例1及び2に従って調製した物質と同様であった。

例4. 本例は、発明の骨代用物質の調製について記載する。

本例において用いるリン酸二カルシウム2水和物( $\text{DCPD}$ )を、下記のようにして調製した。溶液Aは、室温で、 $\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$  (リン酸水素二アンモニウム)を蒸留水500mlに $\text{pH}$  4.6~4.8で急速に溶解することによって、

調製した。溶液Bは、室温で、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (硝酸カルシウム4水和物) 17.1gを蒸留水250mlに急速に溶解することによって、調製した。リン酸二カルシウム2水和物は、室温で、溶液Bを攪拌する溶液Aに急速に加えることによって、調製した。直ぐ後に、サンプルを、ろ紙(0.05平方m)を使用して並のろ過速度及び約 $10^{-2}$ トルの減圧でろ過した。その物質は薄いケーキを形成し、これを、蒸留水約2リットルで洗浄し、次いで室温で24~72時間乾燥させた。

例1、2又は3からの調製した反応性非晶質リン酸カルシウム物質にリン酸二カルシウム2水和物( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )を50:50重量%で、乳鉢及び乳棒を使用して3~5分間物理的にドライミックスした。次いで、水(1ml/

混合物質 1 g) を粉末混合物に加えてペースト様コンシステンシーを生じた。加える  $H_2O$  の量は、濃厚なペーストを所望するか或は希薄なペーストを所望するかどうかに応じて、変えた。ペースト物質を、次いで、湿気のある組織環境に入れ、そこで体温 ( $37^{\circ}C$ ) に到達した際に、発熱挙動なしで、硬化して固体マスになった。硬化プロセスは、それを冷却温度  $4^{\circ}C$  の中に入れることによって幾時間も遅らせることができた。硬化された物質は、合成のヒドロキシアパタイト物質について報告されている溶解度を越える固有の溶解度特性を有するナノメートルサイズの結晶性不良なヒドロキシアパタイトで構成された。これは、図5に立証されており、図5では、調節された pH 緩衝液中に  $37^{\circ}C$  において 24 時間にわたって放出されるカルシウムイオン濃度は、標準の結晶性ヒドロキシアパタイト物質に (カーブ 52) に比べて、本発明の結晶性不良な HA 物質の場合に、相対的に高くなった。

例 5. 本例は、選定した粒径を有する物質を使用する骨代用物質の調製を立証する。

例 1、2 又は 3 からの調製した反応性非晶質リン酸カルシウム物質に  $100\mu m$  よりも小さい粒径を有するリン酸二カルシウム 2 水和物 ( $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ ) を 50 : 50 重量% で、8505 アルミナ粉砕チャンバーを有する SPEX 8510 実験室ミルを使用して 2 分間物理的にドライミックスし、次いで、篩分けして  $100\mu m$  よりも小さいサイズにした。次いで、水 ( $1ml$  / 混合物質

1 g) を粉末混合物に加えてペースト様コンシステンシーを生じた。

例 6. 例 1、2 又は 3 で調製したままの反応性非晶質リン酸カルシウム物質にその他のリン酸カルシウム化合物を、例 4 に記載する方法に従ってドライミックスした。これらの化合物は、下記を含み、これらに限定されない： $Ca(PO_3)_2$  (メタリン酸カルシウム)、 $Ca_7(P_5O_{16})_2$  (リン酸七カルシウム)、 $Ca_2P_2O_7$  (ピロリン酸カルシウム)、 $Ca_3(PO_4)_2$  (リン酸三カルシウム)。ドライ混合物比を適宜に計算して、反応性リン酸カルシウムに混合した化合物の  $Ca/P$  モル比に応じて、 $Ca/P$  比 1.5 ~ 1.70 であった。生成した物質は、図5に示すのと同じ溶解度特性を有する結晶性不良なヒドロキシアパタイト



ト固体であった。

例7. 本例は、結晶性不良なヒドロキシアパタイト固体を形成するための注入適性ペーストの調製について記載する。

例4又は6に従って調製したドライミックスした物質に蒸留した $H_2O$  (2.3 ml / g) を混合した。手で容易に造形することができる又は内直径が0.5 mm程に小さいノズルを通して注入することができるペーストを形成した。ペーストを4℃で2～3時間冷却した後に、流動性が増大した。

その物質は、気密の容器中に4℃で約12時間の間ペースト形態で硬化しないで貯蔵することができた。

例8. 生成物骨代用物質の結晶性含量を、X線回折及びI-R分光測定によってモニターした。

図7a～dは、例4に記載する通りのDCPDと反応性非晶質リン酸カルシウムとの間の反応生成物のX線回折スペクトルである。反応混合物を37℃の湿った環境に入れ、X線回折分光測定によって異なる時間に調べた。X線走査条件は、(a) 銅陽極、(b)  $\lambda = 1.4540598 \text{ \AA}$ 、並びに(c) ステップ0.02°及びステップ間隔2秒において走査範囲20～35°である。図8は、リン酸二カルシウム2水和物の赤外スペクトル(a)、発明の活性化されたACPの赤外スペクトル(b)、及び本発明の結晶性不良なHAの赤外スペクトル(c)を示す。

図7a～dのサンプルを、それぞれ0、20分、75分及び2時間の間インキュベートした。サンプルを注記した時間で取り出し、かつ凍結乾燥させて化学的特性を保存した。反応の開始において取った図7aは、出発ACP及びリン酸二カルシウムに起因し得るピークの組合せを表わす(構成成分XRDパターンについて図6を参照)。結晶性二リン酸二カルシウムについて約20.25°、23.5°、29.5°、30.75°及び34.2°において鋭いピークが容易に観測される。反応時間が増大するにつれて、鋭い結晶性ピークが低下し、広い(非晶質)ピークが、26°、28.5°、32.0°及び33.0°に中心を置いて現れる。75分の反応の後にスペクトルに変化がなく、これは、反応が本質

的に1時間に過ぎない時間で完了することを示すことに留意することは、興味がある。発明の骨代用物質のX線回折図(図7d)を、図9に示す自然発生の骨のX線回折図に比較することができる。2つのスペクトルはほぼ同じであり、発明の骨代用物質の生物測定が近いことを示す。

例9～14： これらの例は、骨代用物質の形成において使用すべき注入適性なペーストのコンシステンシー及び反応性に流体容積が及ぼす効果を立証する。ペーストの各々を上記の例7に記載する通りにして調製し、室温及び37℃におけるコンシステンシー及び反応の速度を求めた。観測を表2に報告する。

表2. 水容積を変動させて造った骨代用物質1グラムの成形適性

例番号	水容積 (mL)	成形適性	注入適性	硬化時間(分) (4℃/RT/37℃)
9	0.7	— クランブル	—	-/-/-
10	0.8*	+++ 形成容易なペースト	+	>60/>60/30
11	0.9*	++ 練り歯磨き	++	>60/>60/30
12	1.0	+ 液体練り歯磨き	+++	>60/>60/30

\*これらのサンプルは、いくつかの状況(例えば、蒸発)下で、室温において1時間にわたっていくぶんすっかり乾燥するかもしれない。そのような場合には、水を更に加えて元のコンシステンシーを回復させてもよい。

例13： この研究の目的は、モデルを、発明の結晶性不良なヒドロキシアパタイトカルシウム骨代用物質のホスフェートセラミック物質をニュージーランドホワイトラビットの脛骨の手術により生成した欠陥中に移植した際の移植されたそのの効能の分析として評価するにあった。

#### I. テスト品及び動物

テスト品： 使用するテスト品を例7に記載する通りにして調製したが、タンバ

ク質又はペプチド生物学的活性について最適なpH（サリーン）範囲を有する緩衝溶液を使用した。

動物：この研究において、7匹の成体の雄及び雌NZWラビット（2.5～3.0kg）を使用した。動物は、Pine Acres Rabbitry/Farmから得た。動物を最低10日間隔離及び順応に保った後に、研究を開始した。動物を、獣医によって全般的な健康について評価させた後に、隔離から解いた。動物を、個々に吊したステンレスチールケージに入れた。ケージの下の滴下パン中にかんなくずを使用した。動物を、番号を付けた耳タグ又は入れ墨により及び対応するケージカードによって識別した。動物は、すべて同じ処置を受けた。一つの欠陥を一つの脛骨に入れた。評価するためのタイムポイントは、0、2、4、及び8週であった。

手術手順：無菌の技術を用いて適当な麻酔を得た後に、切開を近位の脛骨上に造った。軟組織をそらせて骨を暴露した。低速歯科用ハンドピースドリルに5mmトレフェンを、必要に応じて灌注（0.9%生理的食塩水）しながら使用して、骨盤をフリーに切り裂いて移植するための部位を造った。サリーンとの骨代用物質ペースト形態混合 $\alpha$ -BSMを欠陥に入れた。この方法を用いて、動物当たり1サンプルを施した。軟組織を、次いで層で3-0縫合物質で閉じた。動物をモニターし、目覚めた際にブプレノルフィン（buprenorphine）（0.02～0.05mg/kg、皮下に）及びセファロチン（20mg/kg、皮下に）を与えた。鎮痛剤及び抗生物質を、手術した後5～7日間、1日に2度投与した。

## II. 実験観察

臨床上の観察及びレントゲン写真：動物の全般的な健康及び特に歩行に関する安寧を、少なくとも毎週行った。脛骨のレントゲン写真を、手術後及び剖検の時を含む予定した間隔で行った。

動物を予定した期間治癒させた。脛骨のレントゲン写真のために、動物に麻酔をかけた。かかる脛骨のレントゲン写真は、研究全体にわたって2週毎に取った。レントゲン写真を用いて研究の期間を決めた。およそ2週毎に、2匹の動物を

犠牲にし、テスト部位を組織学のために取り去った。動物を毎日モニターして食餌或は挙動の変化が起きるかどうかを見た。研究の終りに、動物を、処方した安楽死溶液（ケタミンHCl及びXylazine、次いで飽和KCl）を過剰投与することによって安楽死させた。

顕微鏡的病理学： 移植部位を未脱灰及び脱灰セクションとして調製した。脱灰スライドを、プラスチック埋設ライトグリーンベークフクシン（fucsin）90ミクロンスライドとして調製し；未脱灰スライドを、ヘマトキシリン及びエオシン及びマソンの三色染色で染色した。スライドを、実験室動物病理学において経験を有するボード公認の獣医病理学者（ACVP）によって顕微鏡的に評価させた。

### III. 結果

臨床上の観察及びレントゲン写真： 脛骨の欠陥のレントゲン写真は、放射密度が経時的に増大するのを示した。

剖検： 脛骨の欠陥部位は、経時的に小さくなるように見えた。外科学により予想されるのと異なる過度の炎症は、肉眼で観察されなかった。

顕微鏡的病理学： 2週で、骨代用物質リン酸カルシウムは、依然欠陥部位において、部位及び局部マクロファージの両方で結晶として観察された。小柱の骨の小さな骨片が、欠陥エッジ及び欠陥部位の両方において見られた。4週までに、デバイスの結晶は、有るとしてもほとんど目に見えず；一層厚くなった小柱の骨が欠陥部位全体にわたって見られた。試験片は、6週及び8週で、デバイスの

跡を有せず；欠陥部位において見られた骨は、非常に厚い小柱の～皮質のタイプの骨であった。

例 1.6： 本例は、例に従って調製した結晶性の及び非晶質のプリカーサー並びに同様のプリカーサーを反応させることによって製造した最終の結晶性不良なHAの赤外スペクトルを比較する。図8aは、例4に記載する通りにして調製したブラッシュ石（DCPD）のIRスペクトルを提示し；図8bは、例1に記載する通りにして調製した、熱処理した後のACPのスペクトルを提示し；及び図8cは、例4に記載する通りにして調製した結晶性不良なHAのIRスペクトル

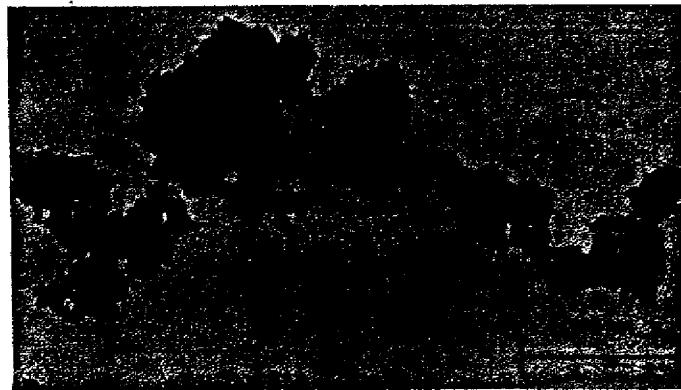
である。

先の記載から明らかにされた目的の中で、上述した目的が効率的に達成され、上記のプロセスを実施する際にかつ挙げた組成においていくつかの変更を、発明の精神及び範囲から逸脱しないでなし得るので、上記の記載に含有されかつ添付図面に示されるすべてのことが、例示として解釈されるべきであり、制限する意味で解釈されるべきでないことを意図することは了解されるものと思う。

更に、下記の請求項の記載が、そこに記載する発明の全体の及び特定の特徴のすべて、並びにそれらの間に入ると言うことができる発明の範囲のすべての記述に及ぶことを意図することは了解されるものと思う。

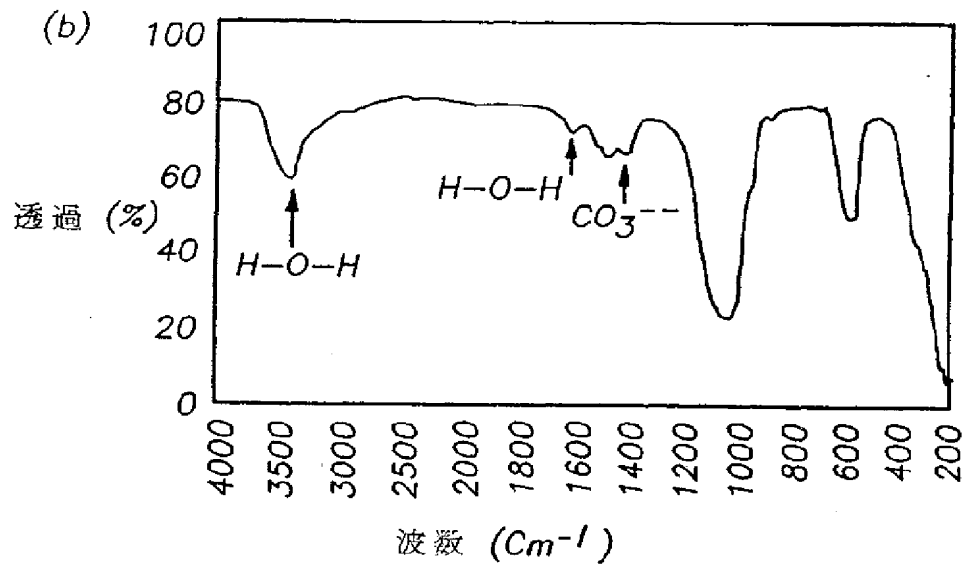
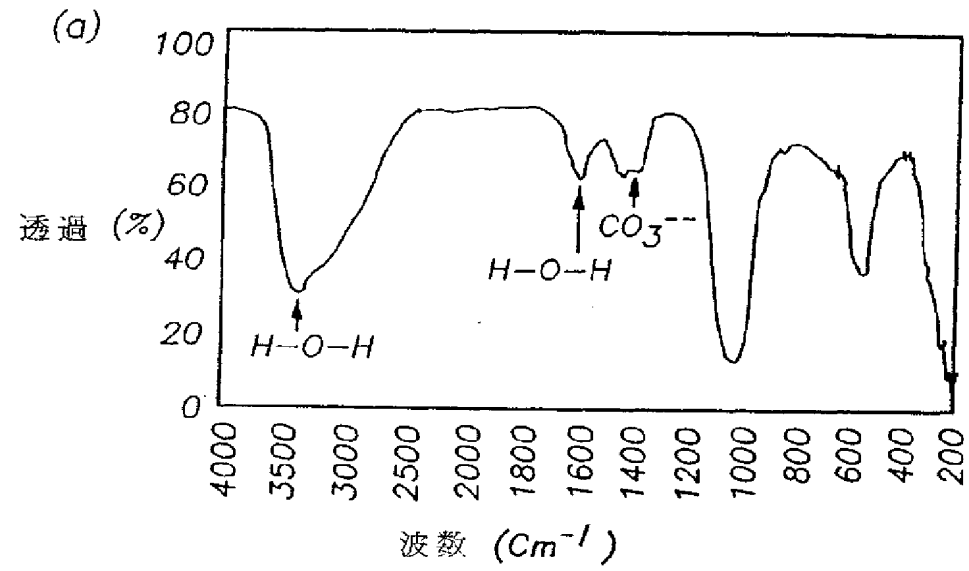
【図1】

**FIG. 1**



【圖 2】

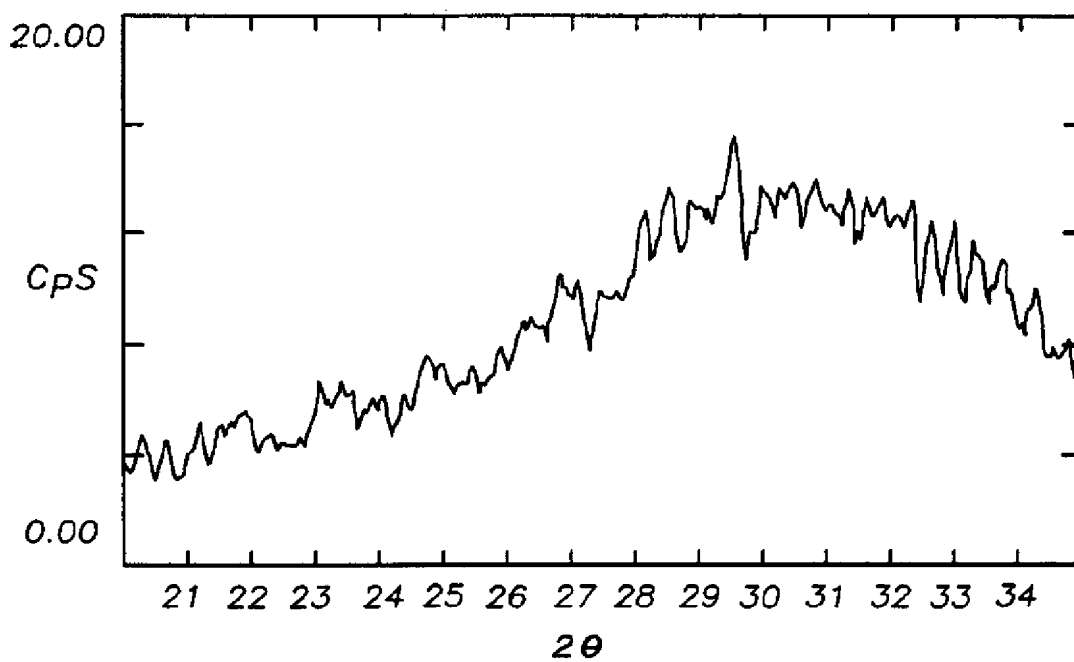
FIG.2



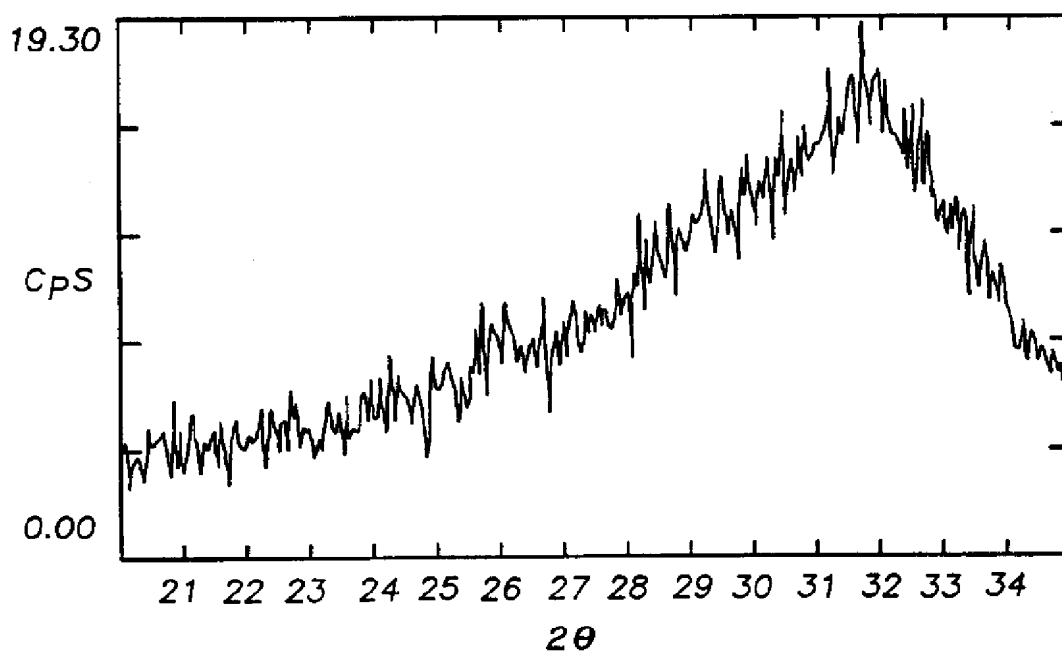
【图3】

**FIG.3**

(a)

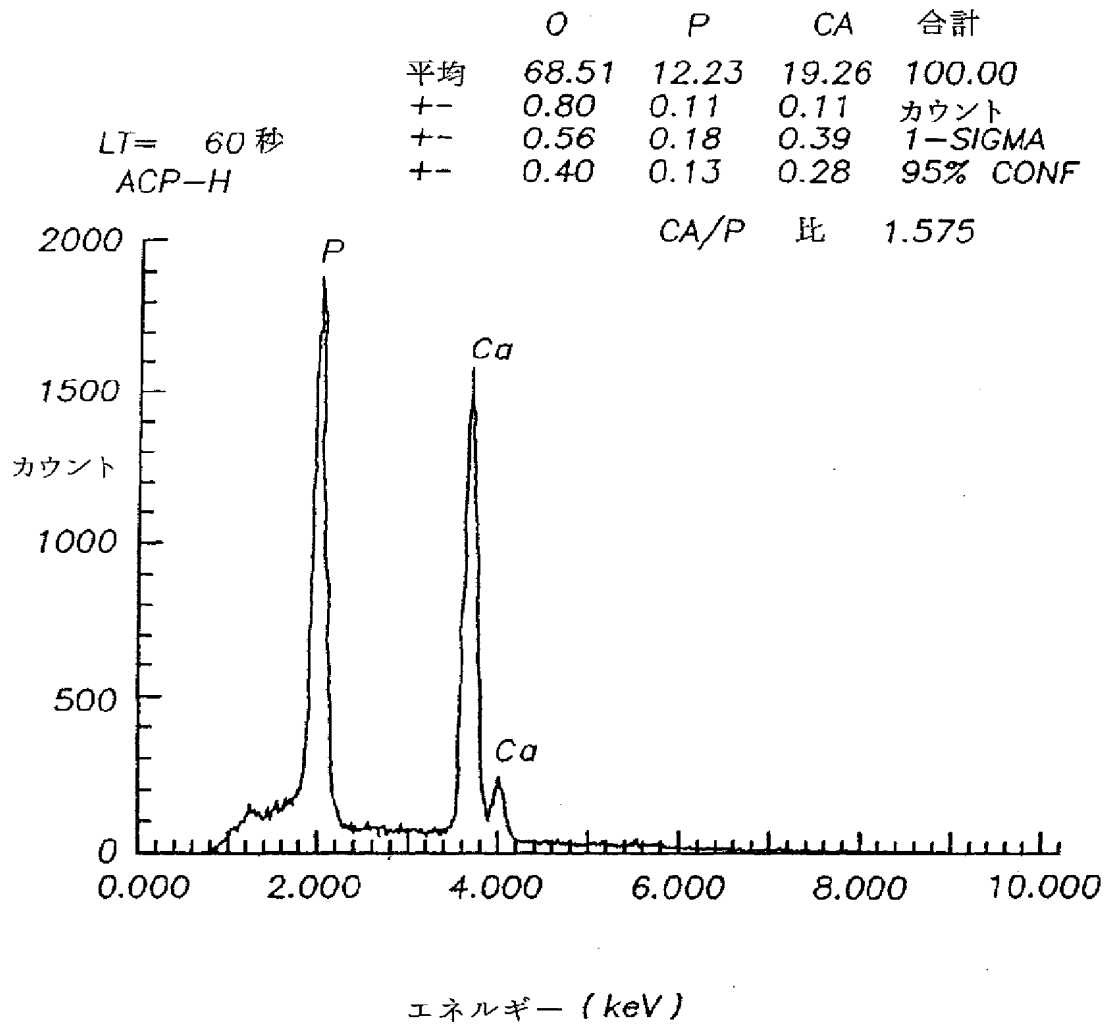


(b)



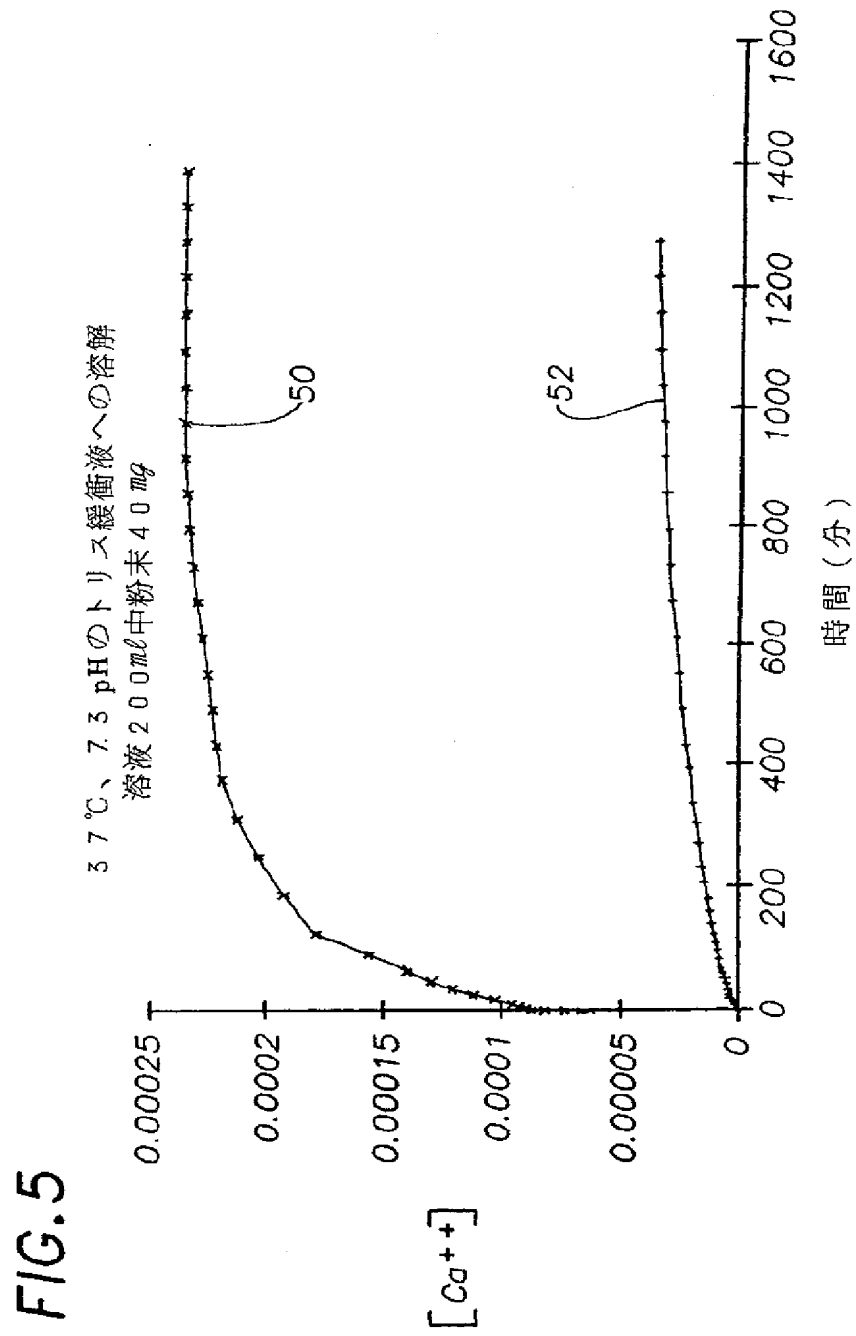
【図4】

FIG.4



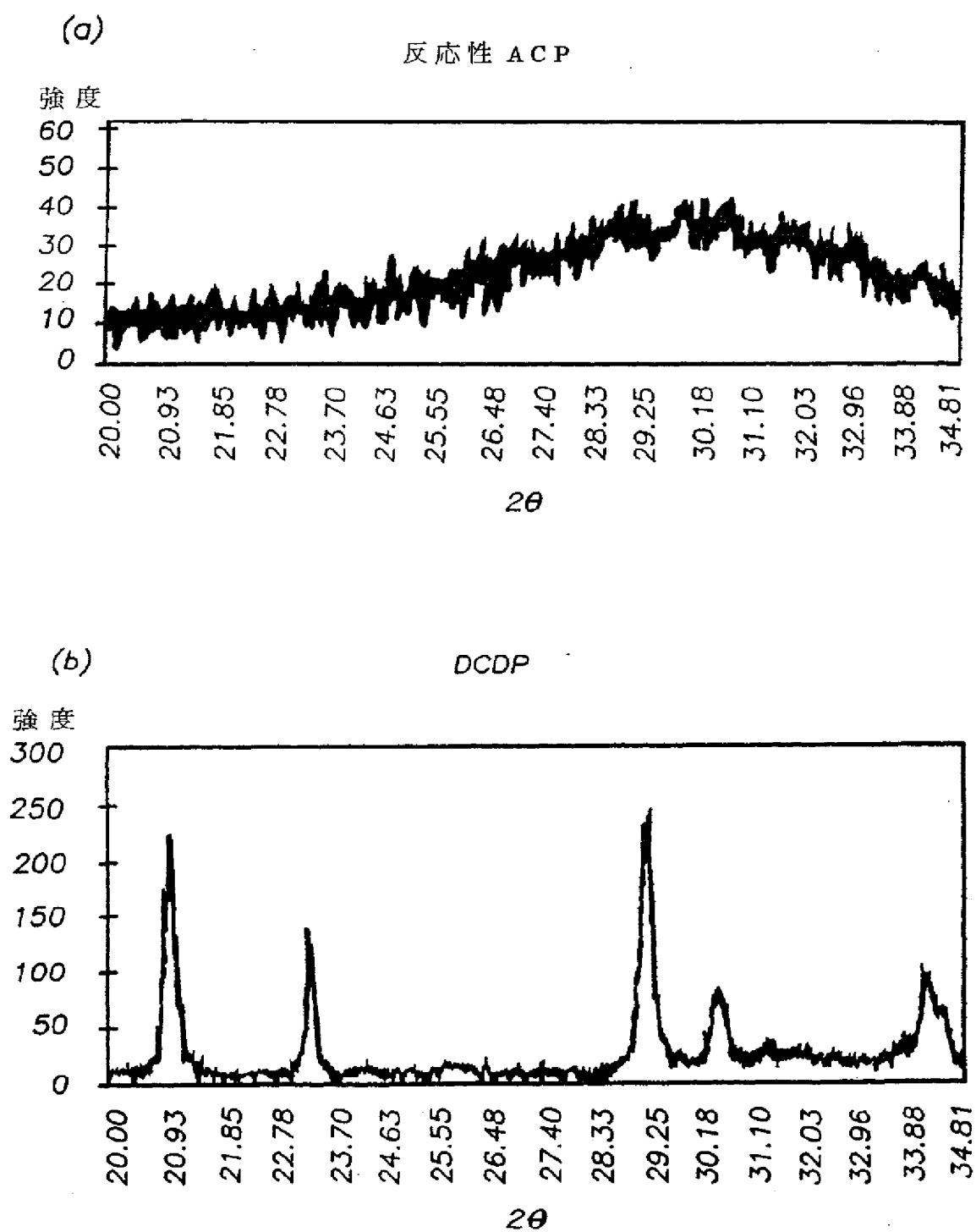


【図5】

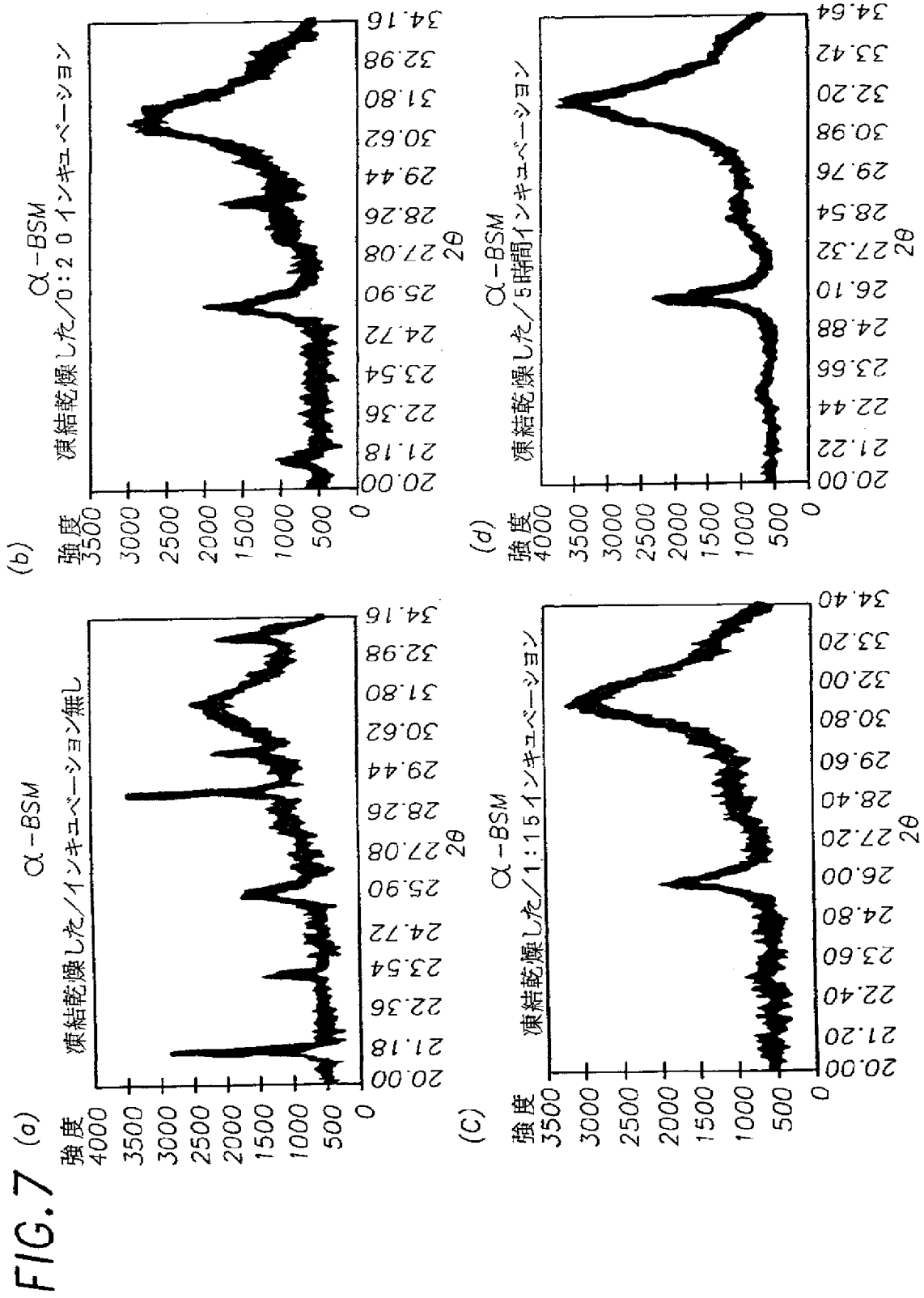


【図6】

FIG.6

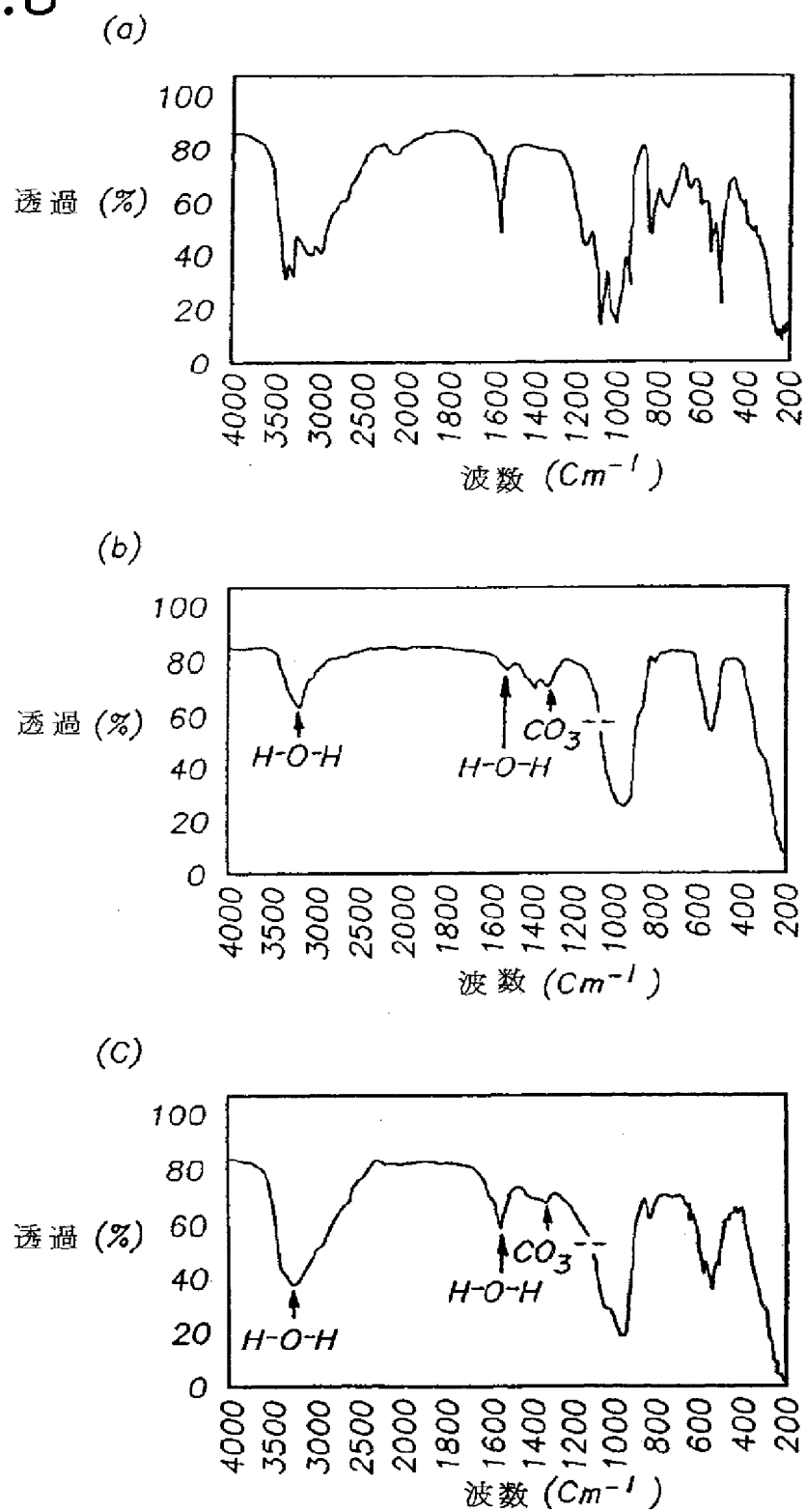


【図7】



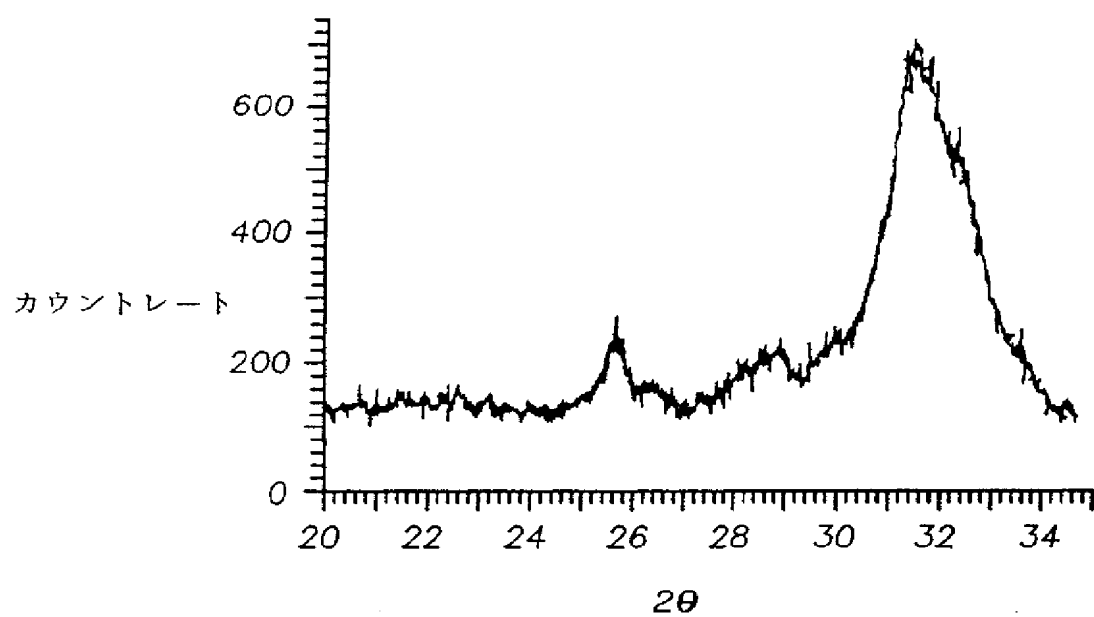
【圖8】

FIG.8



【図9】

FIG.9



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 96/07273

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C01B25/32 A61L27/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>R. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C01B A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8834 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class E33, AN 88-238055 XP002013000 & JP,A,63 170 205 (JGC CORP) , 14 July 1988 see abstract	
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 10, 7 March 1988 Columbus, Ohio, US; abstract no. 78193h, page 166; XP002012999 see abstract & JP,A,62 260 707 (EBARA-INFILCO CO., LTD. ET AL. ) 13 November 1987 --- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 September 1996		27.09.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 MV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fac (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Brebion, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 96/07273

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 24, 10 December 1990 Columbus, Ohio, US; abstract no. 218168j, page 386; XP000158844 see abstract & DENT. MATER. J., vol. 9, no. 1, 1990, pages 58-69, K. ISHIKAWA ET AL.: ---	
A	US,E,33 221 (W.E. BROWN ET AL.) 22 May 1990 cited in the application ---	
A	US,A,5 053 212 (B.R. CONSTANTZ ET AL.) 1 October 1991 cited in the application ---	
A	MATERIALS RESEARCH BULLETIN, vol. 7, no. 11, November 1972, OXFORD GB, pages 1181-1189, XP002012998 N.C. BLUMENTHAL ET AL.: ---	
A	US,A,5 037 639 (M.S. TUNG) 6 August 1991 cited in the application ---	
A	WO,A,94 02412 (UNIVERSITY OF READING) 3 February 1994 cited in the application ---	
A	US,A,4 849 193 (J.W. PALMER ET AL.) 18 July 1989 cited in the application ---	
A	SCIENCE, vol. 267, 24 March 1995, pages 1796-1799, XP000576107 CONSTANTZ B R ET AL: "SKELETAL REPAIR BY IN SITU FORMATION OF THE MINERAL PHASE OF BONE" cited in the application -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 96/07273

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-E-33221	22-05-90	US-E- RE33161	06-02-90
		US-A- 4518430	21-05-85
US-A-5053212	01-10-91	US-A- 4880610	14-11-89
		US-A- 5047031	10-09-91
		US-A- 5129905	14-07-92
		CA-A- 1332495	18-10-94
		EP-A- 0347028	20-12-89
		JP-A- 2022113	25-01-90
		US-A- 5178845	12-01-93
		US-A- 5336264	09-08-94
		CA-A- 1332102	27-09-94
		EP-A- 0416761	13-03-91
		ES-T- 2054258	01-08-94
		JP-A- 3174311	29-07-91
US-A-5037639	06-08-91	US-A- 5437857	01-08-95
		US-A- 5534244	09-07-96
		US-A- 5268167	07-12-93
		US-A- 5460803	24-10-95
WO-A-9402412	03-02-94	AU-A- 4579893	14-02-94
		ZA-A- 9305231	22-12-93
US-A-4849193	18-07-89	AU-B- 617966	05-12-91
		AU-A- 3437389	29-11-89
		CA-A- 1297656	24-03-92
		DE-D- 68910941	05-01-94
		DE-T- 68910941	11-05-94
		EP-A- 0367808	16-05-90
		JP-T- 3500161	17-01-91
		WO-A- 8910896	16-11-89



---

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN

(72)発明者 アイオロバ, マライア  
アメリカ合衆国 02146 マサチューセツツ, ブルックライン, シーウォール アベニュー 123

# Synthesis of reactive amorphous calcium phosphates

**Publication number:** JP11511722 (T)

**Publication date:** 1999-10-12

**Inventor(s):**

**Applicant(s):**

**Classification:**

- **international:** **A61F2/28; A61F2/30; A61K9/20; A61L24/02; A61L27/00; A61L27/12; A61L27/38; A61L27/42; C01B25/16; C01B25/32; A61F2/00; A61F2/02; A61F2/46; A61F2/28; A61F2/30; A61K9/20; A61L24/00; A61L27/00; C01B25/00; A61F2/00; A61F2/02; A61F2/46; (IPC1-7): A61L27/00; C01B25/32**

- **European:** **A61F2/28; A61F2/30C; A61K9/20H2; A61L24/02; A61L27/12; A61L27/38; A61L27/42E; C01B25/16; C01B25/32; C01B25/32A; C01B25/32F; C04B28/34H**

**Application number:** JP19960535130T 19960520

**Priority number(s):** WO1996US07273 19960520; US19950446182 19950519

**Also published as:**

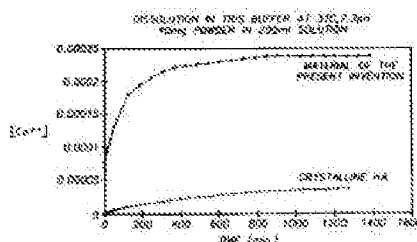
JP4260880 (B2)  
US5683461 (A)  
US6214368 (B1)  
US5650176 (A)  
US5676976 (A)

more >>

Abstract not available for JP 11511722 (T)

Abstract of corresponding document: **US 5683461 (A)**

The present invention provides a novel process for converting a standard inert amorphous calcium phosphate precipitate into highly reactive amorphous solids. The amorphous solids can be used to react with other calcium phosphate solids to form a poorly-crystalline synthetic hydroxyapatite that provides both bioactivity and structural integrity. This novel amorphous material can be reacted with other calcium phosphates at or below 37 DEG C. to form a bone-like material consisting of poorly crystalline hydroxyapatite.



.....  
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide